



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL-AGUA

COSECHA DE MICROALGAS MEDIANTE FLOTACIÓN POR OZONO-AIRE PARA LA PRODUCCIÓN
POTENCIAL DE BIODIESEL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
M. I. A. MARÍA TERESA VALERIANO GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA-UNAM
COMITÉ TUTOR
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA-UNAM
DR. JESÚS GRACIA FADRIQUE, FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Cd. México Octubre 2018.



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Gracia Fadrique Jesús

Secretario: Dr. Buitrón Méndez Germán

Vocal: Dr. Thangarasu Pandiyan

1^{er.} Suplente: Dr. González Sánchez Armando

2^{do.} Suplente: Dra. Orta Ledesama María Teresa

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Dra. María Teresa Orta Ledesma:

NOMBRE

FIRMA

(Segunda hoja)

Este trabajo fue realizado en:

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015

No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del
09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por apoyo brindado durante cada una de las etapas de mi desarrollo académico.

Al Posgrado de Ingeniería de la UNAM, por la formación recibida durante mis estudios de Doctorado en Ingeniería Ambiental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del programa de CONACYT -Becas Nacionales-CVU 421885 por el apoyo recibido durante la realización de de mis estudios de doctorado.

Al Fondo Sectorial CONACYT -SENER-Sustentabilidad Energética por el apoyo otorgado a este proyecto de investigación. Número de proyecto 220704.

A mi asesora la Dra. María Teresa Orta Ledesma por todo el apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutor el Dr. Jesús Gracia Fadrique y el Dr. Germán Buitrón Méndez por todos sus comentarios y sugerencias durante la realización de este trabajo de investigación.

A los miembros de mi comité ampliado el Dr. Armando González Sánchez y el Dr. Pandiyan Thangarasu por su incorporación a mi comité tutor y por sus comentarios que me permitieron mejorar mi trabajo.

A los académicos del grupo de Investigación, la Mtra. Isaura Yañez Noguez y al Dr. Ignacio Monje Ramírez por su colaboración y ayuda brindada a lo largo de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Sharon Velásquez Orta por todo el apoyo y aporte brindado a este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A Daniela Guerrero Valeriano por ser mi mayor motivación en la vida, por ti quiero ser una mejor persona. Te amo hija.

A mis padres Esther González y Guillermo Valeriano, por todo su amor y apoyo incondicional. Este es un logro más de ustedes y mío. Sigo sin encontrar como agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Miguel Ángel y Guillermo Javier, por ser los más grandes cómplices de vida. Y por que son los mejores compañeros de vida, nada sería igual sin ustedes.

A Guillermo Guerrero por que decidimos compartir nuestra vida, crecer juntos y ser mejores cada día. Te agradezco la motivación constante que me impulsa a ser mejor cada día. Te amo.

A Andrea, Gyslayne, Erick e Isaac no encuentro una definición para ustedes, tal vez lo mas cercano sería familia. Les agradezco tanto apoyo, tantos buenos consejos y tanto cariño.

A mis compañeros que se convirtieron en mis amigos, Carlos, Verito, Axa, Lidia, Enrique, Rebeca, César, John, Lalo, Marianne, Amaranta y Mariana. Gracias por tantas carcajadas, esta experiencia no hubiera sido la misma sin cada uno de ustedes.

A mis compañeros del cubículo 410 por toda su comprensión.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL.....	13
Objetivo General	13
Objetivos particulares.....	13
3. HIPÓTESIS.....	13
4. MARCO TEÓRICO	14
4.1 Microalgas.....	14
4.2 Cultivo de microalgas.....	18
4.3 Cosecha de microalgas.....	21
4.4 Balance de energía para la producción de biodiesel a partir de microalgas	39
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	43
5.1 Fase 1 de experimentación	45
5.2 Fase 2 de experimentación	48
5.3 Fase 3 de experimentación	52
5.4 Balance de energía.....	56
6. RESULTADOS.....	60
6.1 Efecto del ozono en la liberación de tensoactivo y en la desestabilización de la microalgas durante el proceso de cosechado.....	60
6.2 Cosecha de microalgas cultivadas en agua residual mediante la flotación con ozono como pretratamiento, seguido de la flotación con aire.	70
6.3 Optimización de las condiciones de operación del sistema de cosechado microalgal mediante flotación por ozono-aire.	80

6.4 Efecto de la flotación ozono-aire en el rendimiento de lípidos, carbohidratos, proteínas y perfil lipídico de las microalgas.....	91
6.5 Balance energético para la producción de biodiesel incluyendo la flotación ozono-aire como método de cosecha de microalgas.....	102
7 CONCLUSIONES.....	105
8 REFERENCIAS.....	106
9 PUBLICACIÓN INTERNACIONAL DEL TRABAJO DE TESIS.....	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Producción de biomasa y remoción de nutrientes a partir de agua residual.	20
Tabla 2 Resumen de los métodos para cosecha de biomasa microalgal.....	24
Tabla 3 Casos de estudio para la ozono flotación como método de cosecha.	31
Tabla 4 Comparación de los métodos de ruptura celular para extracción de metabolitos (Gunerken, et al., 2015).....	33
Tabla 5 Consumo energético por la etapa de cultivo según Jorquera (2010).	41
Tabla 6 Importancia experimental de las variables probadas en el proceso de flotación con ozono, Nivel de significancia fue de 95%.	67
Tabla 7 Importancia experimental de las variables probadas en el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.	78
Tabla 8 Comparación de los resultados obtenidos con la literatura publicada.	79
Tabla 9 Importancia experimental de los factores probados: Dosis de ozono y flujo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa y mg Lípidos/mg Biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.	83
Tabla 10 Importancia experimental de los factores probados: Flujo y tiempo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa y mg Lípidos/mg Biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.	86
Tabla 11 Importancia experimental de los factores probados: Dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.	89
Tabla 12 Importancia experimental de los factores probados: Dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de mg lípidos/mg Biomasa, mg CHO /mg Biomasa, mg PT/mg Biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.	93
Tabla 13 Condiciones óptimas del proceso de flotación ozono-aire obtenidas a partir del análisis estadístico, para el rendimiento de biomasa, lípidos, carbohidratos y proteínas	94
Tabla 14 Concentrado de resultados obtenidos para el proceso de flotación con ozono y flotación ozono-aire durante el trabajo de investigación.	95
Tabla 15 FAME´s de <i>Scenedesmus obliquus</i> cosechada por centrifugación y flotación ozono-aire. Las condiciones de flotación ozono-aire se realizaron a 0.16 mg O ₃ /mg Biomasa.	98
Tabla 16 Comparación entre los resultados experimentales para el cosechado de <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Desmodesmus sp.</i>	99
Tabla 17 FAME´s obtenidos a partir de <i>Desmodesmus sp.</i> cosechada por centrifugación y flotación ozono-aire.	101
Tabla 18 Biomasa necesaria para llevar a cabo la producción de una tonelada de biodiesel anual.	102
Tabla 19 Ejercicio energético para la producción de biodiesel a partir de <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Desmodesmus sp.</i>	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas (Rashid, et al., 2014; Halim, et al., 2012).....	17
Figura 2 Ionización de los grupos funcionales ubicados en la superficie de la microalga en función del pH. Para las microalgas el punto de carga cero se encuentra a pH de 4-5 (Gregory, 2006).....	22
Figura 3 Efecto del ozono en la desestabilización de células de microalgas, adaptado de Langlais et al, (1991).....	29
Figura 4 Liberación de material intracelular causado por la lisis celular que produce el ozono, adaptado de Langlais et al. (1991).....	30
Figura 5 Esquema de interacción del ozono con los lípidos, (Roshchina & Roshchina, 2003).....	34
Figura 6 Reacción de ozonólisis del ácido linoleico (Cunha, et al., 2011).....	35
Figura 7 Esquema de interacción del ozono con proteínas.....	36
Figura 8 Mecanismo de acción de las proteínas como tensoactivos.....	38
Figura 9 Experimentación realizada durante este trabajo de investigación.....	44
Figura 10 Diagrama experimental para las pruebas de ozono flotación.....	46
Figura 11 Diagrama experimental para las pruebas de flotación de ozono-aire.....	50
Figura 12 Procesos y energías consideradas dentro del ejercicio de balance energético para la producción de biodiesel a partir de microalgas.....	57
Figura 13 A) Espuma formada durante el proceso de cosechado de microalgas por ozono flotación, B) Gradiente de biomasa en la espuma durante el proceso de cosechado.....	61
Figura 14 Efecto de la flotación de ozono en la liberación de proteína total a partir de microalgas lavadas y no lavadas.....	62
Figura 15 Relación entre la recuperación de la biomasa y la proteína total cosechada durante la flotación con ozono. A) Microalgas lavadas, B) Microalgas no lavadas.....	63
Figura 16 Abatimiento de la tensión superficial en función de la proteína total liberada durante el proceso de flotación con ozono.....	64
Figura 17 Abatimiento de la tensión superficial en función de la dosis de ozono durante el proceso de flotación con ozono.....	65
Figura 18 Gel de SDS-PAGE para muestras de proteínas de microalgas: MW) Marcador de peso molecular (Bio-Rad), Dual Color (kDa); A) Método alcalino, B) 0.0695 mg O ₃ /mg Biomasa, C) 0.1082 mg O ₃ /mg Biomasa y D) 0.136 mg O ₃ /mg Biomasa.....	66
Figura 19 Superficie de respuesta para la recuperación de biomasa (A) y lípidos (B) en función de la concentración de ozono (2-8 mg/L) y el tiempo de flotación con ozono (10-40 min).....	68
Figura 20 Efecto de la dosis de ozono en: A) Biomasa recuperada, B) Lípidos recuperados, C) Recuperación de lípidos por biomasa, D) Eficiencia de recuperación.....	69

Figura 21 Efecto de la flotación con ozono en el potencia zeta, condiciones de proceso: A) 300 mg Biomasa/L y 5 mg O ₃ /L; B) 300 mg Biomasa/L y 10 mg O ₃ /L; C) 600 mg Biomasa/L y 5 mg O ₃ /L y D) 600 mg Biomasa/L y 10 mg O ₃ /L.....	71
Figura 22 Efecto de la flotación con ozono en la liberación de tensoactivo proteínico, condiciones de proceso: A) 300 mg Biomasa/L y 5 mg O ₃ /L; B) 300 mg Biomasa/L y 10 mg O ₃ /L; C) 600 mg Biomasa/L y 5 mg O ₃ /L y D) 600 mg Biomasa/L y 10 mg O ₃ /L.....	72
Figura 23 Flóculos microalgas-materia orgánica presentes en el cultivo de microalgas. Observados con un objetivo de 40x.....	73
Figura 24 Propuesta de mecanismo de reacción para el pretratamiento de Scenedesmus obliquus con ozono a un pH de 9.2±0.5.....	74
Figura 25 Porcentaje de recuperación de la biomasa microalgal en función de la estabilidad de la microalga y la liberación de tensoactivo proteínico.....	76
Figura 26 Biomasa cosechada durante el proceso de flotación con ozono aire. A) Biomasa: 300mg/L y C O ₃ Entrada: 5mg/L; B) Biomasa: 300mg/L y CO ₃ Entrada: 10mg/L; C) Biomasa: 500mg/L y CO ₃ Entrada: 5mg/L y D) Biomasa: 500mg/L y C O ₃ Entrada: 10mg/L.....	77
Figura 27 Grafica de cajas para la recuperación de la biomasa en función del tiempo de pre-tratamiento.....	78
Figura 28 Efecto de la dosis de ozono y el flujo de aire en la recuperación de la biomasa.....	81
Figura 29 Efecto de la dosis de ozono y el flujo de aire en el rendimiento de lipidos presentes en las microalgas (mg Lípido/mg Biomasa).....	82
Figura 30 Grafica de superficie de respuesta para el rendimiento de lípidos (mg Lípidos/mg Biomasa) durante el cosechado por flotación ozono-aire.....	83
Figura 31 Efecto del flujo y tiempo de la flotación con aire en la recuperación de Biomasa.....	84
Figura 32 Efecto del flujo y tiempo de aire en el rendimiento de lipidos presentes en las microalgas (mg Lípido/mg Biomasa).....	85
Figura 33 Grafica de superficie de respuesta para la recuperación de Lípidos en función del tiempo y flujo de la flotación con aire.....	86
Figura 34 Rendimiento de Biomasa cosechada por efecto los factores evaluados, FA: Flujo de aire (L/min), CO ₃ entrada: Concentración de ozono (mg O ₃ /L) y DO: Dosis de ozono (mg O ₃ /mg Biomasa).....	88
Figura 35 Modelo de superficie de respuesta obtenido para el cosechado de biomasa en función a la dosis de ozono y la concentración de ozono, el modelo presentado mantiene el flujo de aire constante a 1.5 L/min.	90
Figura 36 Rendimiento de mg X/mg Biomasa (X: lípidos, CHO's y Proteínas) en la biomasa cosechada por efecto los factores evaluados, FA: Flujo de aire (L/min), CO ₃ Entrada: Concentración de ozono (mg O ₃ /L) y DO: Dosis de ozono (mg O ₃ /mg Biomasa).....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

CHO's	Carbohidratos
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
C _{O3} Entrada	Concentración de ozono a la entrada
C _{O3} Salida	Concentración de ozono a la salida
CMC	Concentración micelar crítica
DOA	Dosis de Ozono Aplicada
ET	Eficiencia de Transferencia
FAME	Ésteres alquílicos de ácido graso
g	Gramo
h	Horas
Ha	Hectárea
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
kWh	Kilovatio por hora
L	Litro
mg	Miligramo
mg Lípidos/mg Biomasa	Rendimiento de Lípidos totales en función a la biomasa
mg O ₃ /mg Biomasa	Dosis de Ozono
mg PT /mg Biomasa	Rendimiento de Proteína total en función a la biomasa
MJ	Megajoule
mL	Mililitro
mV	Milivoltios
NER	Relación de energía neta
O ₃	Ozono
PT	Proteína total
Q _A	Flujo de aire
Q _{O3}	Flujo de gas ozono de entrada
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SST	Solidos suspendidos totales
T	Tiempo
V	Volt
VM	Volumen de la muestra
W	Watts
ζ	Potencial zeta

RESUMEN

En este trabajo de investigación se evaluó la implementación de un nuevo método de cosechado para microalgas a través de la flotación por ozono-aire. Para ello, fue necesario conocer el proceso de ozono flotación, del cual se estudió el efecto del método de cosecha sobre la excreción de proteínas, la extracción de lípidos y la recuperación de biomasa microalgal. Se trabajó con un consorcio mixto de microalgas, obtenidas del lago Nabor Carrillo, ubicado en el ex lago de Texcoco. El lago es alimentado con agua residual tratada, el consorcio esta principalmente conformado por cianobacterias (*Arthrospira sp.*, *Spirulina sp.*, *Oscillatoria sp.*) y algas verdes (*Desmodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.*). El proceso de cosechado de microalgas fue realizado a diferentes condiciones de dosis de ozono (0.028-0.136 mg O₃/mg Biomasa). Durante el proceso de ozono flotación, se observó la formación de espuma, la cual se atribuyó a la liberación de proteínas intracelulares de las microalgas. Las proteínas presentaron actividad tensoactiva, ya que redujeron la tensión superficial del agua hasta valores de 42.73 mN/m. Para alcanzar la reducción de la tensión superficial y la separación de la biomasa, se estimó que era necesaria una concentración crítica micelar (CMC) de 550 ± 17 mg PT/L. C-Ficocianina fue identificada como una de las principales proteínas liberadas durante el proceso de ozono flotación, la cual es una proteína característica de las cianobacterias. Asimismo, se encontró que durante el proceso de cosechado la recuperación de biomasa fue directamente proporcional a la dosis de ozono. El cosechado por ozono flotación produjo la recuperación del 75% de la biomasa presente en el medio acuoso, lo cual se logró con la dosis de ozono de 0.14 mg O₃/mg Biomasa. Sin embargo, se encontró que altas dosis de ozono afectan la recuperación de lípidos presentes en las microalgas, es por ello que el contenido lipídico del 0.16 mg lípidos/mg Biomasa se logró a 0.047 mg O₃/mg de Biomasa.

Posteriormente, se planteó la utilización del ozono solo como un pretratamiento, el cual permita la desestabilización del cultivo de microalgas y la producción de tensoactivo proteínico, para finalizar el cosechado mediante flotación con aire. Durante esta fase de experimentación se trabajó con la microalga verde, *Scenedesmus obliquus* cultivada en el laboratorio con agua residual procedente de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de Cerro del Agua, CU. Lo anterior con la finalidad de tener un mayor control en los ensayos de ozono flotación y experimentar con cultivos de mayores concentraciones de microalgas. La ozono flotación como pretratamiento, se encontró que un tiempo de contacto de 2 minutos y una dosis de ozono de 0.02mg O₃/mg Biomasa, desestabilizaban (-25 a -11 mV) a *Scenedesmus obliquus* cultivado en agua residual, además que dicho pretratamiento generó la liberación de tensoactivo proteínico (0.239 mg PT/mg Biomasa) contenido en las microalgas. Comparando los porcentajes de biomasa cosechada por flotación con ozono y flotación con ozono-aire, se observó que no existía una diferencia significativa en la recuperación de la biomasa por estos métodos de cosecha (60%).

En la etapa final de investigación se decidió establecer un intervalo superior de dosis de ozono (0.04-0.16 mgO₃/mg Biomasa), deseándose lograr un mayor rendimiento de biomasa cosechada. Se establecieron como variables de operación, además de la dosis de ozono: la concentración de ozono (C_{O₃ Entrada}) en un intervalo de

13-25mg/L y el flujo de aire (Q_A) en un intervalo de 0.5-1.5 L/min. Se obtuvo un rendimiento de recuperación de biomasa del 98%, bajo las siguientes condiciones de operación: dosis de ozono de 0.16 mg O_3 /mg Biomasa, $C_{O_3 \text{ Entrada}}$: 18 mg O_3 /L y Q_A : 1.5 L aire/min. Sin embargo, la recuperación de los lípidos no se vio favorecido bajo estas condiciones, ya que se obtuvo un rendimiento de 0.07 mg Lípidos/mg Biomasa, comparado con el 0.1079 mg Lípidos/mg Biomasa que se tenían al inicio del proceso. Esto se puede atribuir a la oxidación de los lípidos presentes en las microalgas. En el caso específico de este trabajo de investigación en el cual la biomasa cosechada fue utilizada para la obtención de biodiesel; se obtuvo que la flotación ozono-aire (dosis de ozono 0.16 mg O_3 /mg Biomasa, $C_{O_3 \text{ Entrada}}$: 25 mg O_3 /L y Q_A : 1.5 L aire/min) obtiene un rendimiento de 0.2295 mg Lípidos/mg Biomasa y la recuperación del 85% de la biomasa. La utilización de una concentración de ozono mayor en este caso 25 mg O_3 /L, reduce el tiempo de ozono flotación para alcanzar la dosis de ozono deseada. Altas concentraciones de ozono favorece una mayor recuperación de lípidos, ya que permea la célula microalgal, sin llegar a la oxidación de los compuestos presentes en la biomasa. Comparando la ozono flotación y la flotación con ozono-aire, se obtuvo que el uso de la flotación con ozono-aire favorece la disminución de la dosis de ozono para el cosechado de la biomasa hasta en un 35% (de 0.22 a 0.16 mg O_3 /mg Biomasa).

De igual forma, se evaluó el perfil lipídico de las microalgas cosechadas por flotación ozono-aire y fue comparado por el obtenido con biomasa cosechada por centrifugación. De forma general, el ácido palmítico (C16:0) y el linolénico (C18:3), presentaron la mayor abundancia relativa en las muestras obtenidas para los diferentes métodos de cosechado. Sin embargo, el cosechado de microalgas por flotación ozono-aire presentó un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados (42.83%), así mismo produjo un decremento en la cantidad ácidos grasos poliinsaturados (46.20%), esto en comparación al cosechado por centrifugación (23.21% de ácidos saturados y 64.39% ácidos grasos poliinsaturados). Este resultado se atribuyó a que los ácidos grasos poliinsaturados se localizan en la pared celular de la microalga, por lo que el ozono reacciona inicialmente con estos.

Por otra parte, se realizó una estimación energética del proceso de producción de biodiesel a partir de biomasa microalgal, para lo cual se calculó la relación de energía neta (NER). Se obtuvo que la relación energética para la producción de biodiesel se incrementa cuando se utiliza flotación con ozono-aire para el cosechado de la biomasa microalgal (NER 1.91-2.18), comparado con la obtenida por el proceso de centrifugación (0.70-1.08). El consumo energético obtenido para el proceso de cosechado por flotación ozono-aire fue de 11.10 MJ/Kg Biodiesel, lo cual representa una disminución del 30% de la energía requerida para el proceso, comparado con la flotación con ozono convencional.

ABSTRACT

In this research work was evaluated the implementation of a new method of harvesting for microalgae through ozone-air flotation. For this, it was necessary to know the ozone flotation process, which studied the effect of the harvesting method on protein excretion, lipid extraction, and microalgal biomass recovery. A mixed microalgal consortium mainly composed of cyanobacteria (*Arthrospira sp.*, *Spirulina sp.*, *Oscillatoria sp.*) and green algae (*Desmodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.*), obtained from Lake Nabor Carrillo, located in the former lake of Texcoco, was studied. The lake is fed with treated wastewater. The microalgae harvesting process was carried out at different ozone dose conditions (0.028-0.136 mg O₃/mg Biomass). During the ozone flotation process, foam formation was observed, which was attributed to the release of intracellular proteins from the microalgae. The proteins showed tensoactive activity since they reduced the surface tension of the water to values of 42.73 mN/m. To reach the reduction of the surface tension and the separation of the biomass, it was estimated that a micellar critical concentration (CMC) of 550 ± 17 mg PT/L was necessary. C-Phycocyanin was identified as one of the main proteins released during the ozone flotation process, which is a protein of cyanobacteria. Likewise, it was found that during the harvesting process, the biomass recovery was directly proportional to the ozone dose. Harvesting by ozone flotation produced the recovery of 75% of the biomass present in the aqueous medium, which was achieved with the ozone dose of 0.14 mg O₃/mg Biomass. However, it was found that high doses of ozone affect the recovery of lipids present in microalgae, which is why the lipid content of 0.16 mg lipids/mg Biomass was achieved at 0.047 mg O₃/mg Biomass.

Subsequently, the use of ozone was proposed only as a pretreatment, which allows the destabilization of the microalgae culture and the production of surfactant protein, to finish the harvested by flotation with air. During this experimentation phase, the green microalga, *Scenedesmus obliquus* was used and was cultivated in the laboratory with wastewater from wastewater treatment plant (WWTP) Cerro del Agua, CU. The above in order to have greater control in ozone flotation tests and experiment with cultures with higher concentrations of microalgae. It was found that a contact time of 2 minutes and an ozone dose of 0.02 mg O₃/mg Biomass, (-25 to -11 mV) *S. obliquus* is destabilized. Furthermore, the pretreatment with ozone, generated the release of surfactant protein (0.239 mg PT/mg Biomass) from microalgae. According to the comparison of percentages of biomass harvested by ozone flotation and ozone-air flotation, there was no significant difference in the recovery of biomass by these harvesting methods (60%).

In the final stage of research, it was decided to establish a higher dose range of ozone (0.04-0.16 mg O₃/mg Biomass), wishing to achieve a higher yield of harvested biomass. The following variables were established in addition to the ozone dose: ozone concentration (C_{O₃ Input}) in a range of 13-25 mg/L and the air flow (Q_A) in a range of 0.5-1.5 L/min. A yield of biomass recovery of 98% was obtained, under the following operating conditions: ozone dose of 0.16 mg O₃/mg Biomass, C_{O₃ Input}: 18 mg O₃/L and Q_A: 1.5 L air/min. However, the recovery of lipids was not favored under these conditions, since a yield of 0.07 mg Lipids/mg Biomass was obtained, compared to the 0.1079 mg Lipids/mg Biomass that were obtained at the beginning of the process. This can be attributed to the oxidation of the lipids present in the microalgae. For this research it was obtained that the ozone-air flotation (ozone dose 0.16 mg O₃/mg Biomass, C_{O₃ Input}: 25 mg O₃/L and Q_A: 1.5 L air/min) reaches a yield of 0.2295 mg Lipids/mg Biomass and the recovery of the 85% of the biomass. The use of a higher ozone concentration in this case 25 mg O₃/L, reduces the ozone flotation time to reach the desired ozone

dose. High concentrations of ozone favor a greater recovery of lipids, since it permeates the microalgal cell, without reaching the oxidation of the compounds present in the biomass. It was obtained that the use of ozone-air flotation, instead of ozone-flotation, favors the reduction of the ozone dose for harvesting the biomass up to 35% (from 0.22 to 0.16 mg O₃/mg Biomass).

Likewise, the lipid profile of the microalgae harvested by ozone-air flotation was evaluated and compared with biomass harvested by centrifugation. In general, palmitic acid (C16:0) and linolenic acid (C18:3), showed the highest relative abundance in the samples obtained for the different harvesting methods. However, harvested microalgae by ozone-air flotation had a higher percentage of saturated fatty acids (42.83%), likewise produced a decrease in the amount of polyunsaturated fatty acids (46.20%), this compared to harvested by centrifugation (23.21 % of saturated acids and 64.39% polyunsaturated fatty acids). This result was attributed to the fact that polyunsaturated fatty acids are located in the cell wall of the microalgae, so that ozone initially reacts with them.

On the other hand, an energy estimate of the biodiesel production process from microalgal biomass was carried out for which the net energy ratio (NER) was calculated. It was found that the energy ratio for the production of biodiesel increase when ozone-air flotation is used for the harvesting of the microalgal biomass (NER 1.91-2.18), compared with that obtained by the centrifugation process (0.70-1.08). The energy consumption obtained for the ozone-air flotation harvested process was 11.10 MJ/Kg Biodiesel, which represents a 30% reduction of the energy required for the process, compared with the flotation with conventional ozone.

1. INTRODUCCIÓN.

Las microalgas surgen como una fuente de materia prima renovable para la producción de una amplia gama de productos, como son la obtención de alimentos humanos o de animales, productos de valor agregado (lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos) y biocombustibles; la obtención de estos son parte de los objetivos de esta tesis de investigación, en específico la producción de biodiesel. A partir de las microalgas es posible obtener diferentes biocombustibles como son: biodiesel, biogás, bioetanol e hidrógeno (Pragya, et al., 2013). Las microalgas son consideradas como materia prima de tercera generación; ya que no compiten con materia prima alimenticia, son de rápido crecimiento, favorecen el secuestro de dióxido de carbono (CO_2), son capaces de adaptarse a diferentes medios de cultivo (como agua residual) y no requieren de tierra de cultivo fértil. De igual forma, las microalgas presentan una alta productividad de lípidos, dependiendo de su contenido lipídico pueden producir hasta 58,700 L de aceite por hectárea de cultivo (30% lípidos por biomasa seca) (Dutta, et al., 2014; Sudhakar, et al., 2018; Chisti, 2007).

El uso del biodiesel a partir de microalgas, es considerado como un remplazo para el diésel convencional. El agotamiento de combustibles fósiles, las emisiones de gases de efecto invernadero y la seguridad energética han favorecido la búsqueda de fuentes renovables para la producción de biocombustibles. Si bien, el poder calorífico del biodiesel (40.4 MJ/Kg) es menor que al diésel convencional (45.1 MJ/kg), tiene una mayor densidad (853 Kg/m^3) lo que representa una mayor cantidad de combustible con respecto al diésel (832 Kg/m^3), lo cual favorecería el aumento de la potencia en el motor (Aminul Islam, et al., 2017). Se ha reportado que la mezcla de biodiésel de microalgas con diésel de petróleo muestra una mejora de la calidad y una reducción de las emisiones de gases, como la eliminación de hidrocarburos.

No obstante el enorme potencial de la biomasa microalgal como materia prima para la producción de diversos productos en general; existen limitaciones y retos por superar para su comercialización, como son: (1) alta demanda de agua para el cultivo de microalgas, (2) alto consumo de nutrientes, y (3) bajo rendimiento energético, debido a los altos consumos de energía, asociados a la cosecha y al secado de biomasa microalgal (Weschler, et al., 2014). Por ejemplo, se estima que la cosecha de la biomasa representa del 20-30% del costo total de producción de biocombustibles (Rawat, et al., 2011).

Se reporta que a nivel industrial se necesita una concentración de biomasa microalgal de 300-400 g/L (lo que representa 30-40% de sólidos), sin embargo, la baja concentración de biomasa en el cultivo de microalgas es de 0.3-5 g/L (0.02-0.5% de sólidos) (Singh & Patidar, 2018; Coward, et al., 2013). Es por ello, que el diseño de un sistema de cosechado que favorezca la concentración de la biomasa microalgal se ha vuelto imprescindible para la obtención de cualquier producto de valor agregado a partir de dicha biomasa. Actualmente, existen diversos métodos de cosecha como son: sedimentación, centrifugación, coagulación-floculación, flotación, ozono flotación, entre otros. Entre estos métodos de cosecha destacan aquellos que no influyan con el uso final de la biomasa, es decir, que no aporten una etapa extra de proceso para el uso de esta, por ejemplo, la eliminación de un agente químico (Muyllaert, et al., 2017).

La ozono flotación surgió como un método de cosecha de microalgas, el cual permite el cosechado de la biomasa a través del burbujeo de ozono un reactor de flotación. Se ha reportado una eficiencia de cosechado de biomasa microalga del 60-75% (Velásquez-Orta, et al., 2014). De igual forma, se ha reportado su beneficio como pretratamiento, ya que permite una mayor extracción de biomoléculas (lípidos, 0.12 mg lípidos/mg biomasa), sin embargo, dosis de ozono superiores a 0.24 mg O₃/mg Biomasa produjeron la oxidación de lípidos presentes en la biomasa (Velasquez-Orta, et al., 2014). El proceso de flotación con ozono, produce un tratamiento al medio de cultivo de las microalgas, ya que, el efluente de la ozono flotación presentaba la eliminación del 100% del nitrógeno total y el 89% de los nitratos (Alves, et al., 2018). Por otra parte, esta reportado que el uso de la flotación con ozono en la producción de biodiesel a partir de microalgas, presenta un costo energético de 0.17 kWh/Kg biomasa, con la condición de que la biomasa tenga un contenido lipídico del 0.2800 mg lípidos/mg biomasa (Nava Bravo, et al., 2018). Sin embargo, el contenido de lípidos depende de muchos factores dificultando así alcanzar un valor tan alto. Si se toma en cuenta, que el cultivo de microalgas en agua residual (medio de cultivo de este trabajo de investigación) presenta un contenido lipídico de 0.14-0.18 mg lípidos/mg biomasa (Kumar Gupta, et al., 2018), repercute en el incremento de la energía necesaria para llevar acabo el cosechado por ozono flotación (Nava Bravo, et al., 2018).

Es por ello, que esta investigación tuvo como objetivo desarrollar un sistema de cosechado de microalgas que implemente la flotación con ozono-aire. Adquiriendo los beneficios del proceso de ozono flotación como un pretratamiento, tales como: la producción de agentes tensoactivos y la desestabilización de las microalgas; sumados a los que aporta la flotación con aire disperso, como son: el uso del aire como gas acarreador, un menor consumo energético y evitar la oxidación de las macromoléculas de interés (lípidos).

2. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

Objetivo General

Desarrollar un sistema de cosechado de microalgas cultivadas en agua residual mediante un proceso combinado de flotación ozono-aire para la producción potencial de biodiesel.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del ozono en la liberación de tensoactivo natural (proteínas) y la desestabilización de microalgas durante el proceso de ozono flotación.
2. Evaluar la cosecha de microalgas cultivadas en agua residual, en un sistema que emplee ozono como pre-tratamiento, seguido de flotación con aire disperso.
3. Optimizar las condiciones de operación del sistema de cosechado de microalgas mediante flotación por ozono-aire para alcanzar los máximos rendimientos de biomasa.
4. Determinar el efecto del proceso de cosechado en la recuperación de lípidos y en el perfil lipídico con potencial de producción de biodiesel.
5. Realizar un balance de energía de la producción de biodiesel incluyendo flotación por ozono-aire como método de cosecha.

3. HIPÓTESIS

El uso del ozono como pre-tratamiento combinado con la flotación con aire disperso, permitirá llevar a cabo la desestabilización y la liberación de proteínas tensoactivas de las microalgas, produciendo así la recuperación de la biomasa microalgal cultivada en agua residual, a un menor costo energético en el proceso de producción de biodiesel, en comparación al biocombustible producido por el método convencional de centrifugación.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Microalgas

Las algas son un grupo de organismos que realizan fotosíntesis a través de los cloroplastos, dicho grupo está dividido en dos principales categorías: macroalgas y microalgas. Las macroalgas son organismos multicelulares, macroscópicos y eucariotas, estas se asemejan a plantas. Las microalgas son células procariotas, las cuales carecen de organelos membranosos (plástidos, mitocondrias, núcleos, aparato de Golgi y flagelos) como son las cianobacterias; de igual forma se encuentran las microalgas eucariotas, las cuales presentan orgánulos que controlan las funciones de la célula, entre estas se encuentran las algas verdes (Clorófitas), algas rojas (Rodófitas) y diatomeas (Bacillariophyceae) (Brennan & Owende, 2010).

Las microalgas presentan diferentes tipos de alimentación, como son: autotrófico o heterotrófico. Las autótrofas utilizan compuestos inorgánicos como fuente de carbono, dentro de los autótrofos se encuentran fotoautótrofos, los cuales usan la luz como fuente de energía; y los quimioautótrofos, los cuales oxidan compuestos inorgánicos para obtener energía (Lee, 2008). Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es la clave de su supervivencia, por lo que convierten la radiación solar y CO_2 absorbido por los cloroplastos en trifosfato de adenosina (ATP), O_2 y energía utilizable a nivel celular (Brennan & Owende, 2010).

La biomasa de microalgas como materia prima para la producción de energía tiene el potencial de producir diferentes biocombustibles, como son: gas de síntesis mediante la gasificación de la biomasa, biometano a través de digestión anaerobia, producción de hidrógeno mediante la reacción directa de la síntesis de la biomasa, biodiesel mediante la transesterificación de lípidos, bioetanol mediante la fermentación de los carbohidratos y obtención de precursores de gasolina a través del craqueo de hidrocarburos e isoprenoides (El-Fatah Abomohra, et al., 2016).

Las microalgas para la producción de biocombustibles han obtenido gran atención, debido a que presentan una alta tasa de crecimiento, son cultivables durante todo el año, crecen en diferentes calidades de agua (dulce, residual y salada), se ha reportado que crecen 100 veces más rápido que las plantas, son utilizadas como tratamiento terciario del agua residual, ya que remueven nitrógeno, fósforo y metales pesados, además de fijar CO_2 mediante la fotosíntesis. Por otra parte, las microalgas producen macromoléculas de gran interés como son: carbohidratos, proteínas y lípidos. Conjuntamente se pueden obtener productos de valor agregado, como son: pigmentos (clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas, ficocianina), vitaminas (vitamina B_{12} , riboflavina), antioxidantes (astaxantina), bioplásticos (peptidoglicano, mucilago de celulosa) y ácidos grasos poliinsaturados (Omega-3, Omega-6); de igual forma pueden ser utilizadas como materia prima para la industria alimenticia (acuicultura y animales), la industria cosmética (cremas anti arrugas) o incluso como fertilizantes (Wayne Chew, et al., 2017; Satyanarayana, et al., 2011).

4.1.1 Microalgas para la producción de Biodiesel

El uso de las microalgas como fuente energética surge de la situación actual de los combustibles fósiles, ya que se considera que las reservas de estos combustibles son finitas, es decir, que llegara el momento en que estas se agoten. Se ha reportado que el combustible fósil se agotara en los próximos 60-80 años (Rashid, et al., 2014). Como una medida preventiva del desabasto de combustible, surge la bioenergía. La bioenergía es la obtención de energía a partir de materiales provenientes de fuentes biológicas (Long, et al., 2013).

Dentro de las diferentes fuentes de energía alternativa se encuentra la biomasa, la cual es utilizada para la producción del 80% de la energía renovable producida en el mundo. El uso de la biomasa en la producción de energía tiene como ventaja: ser una fuente renovable basada en carbono, alta disponibilidad, puede ser almacenada, capacidad de mitigar gases de efecto invernadero (CO_2), puede ser utilizada de manera directa y se puede producir diferentes biocombustibles (Strzalka, et al., 2017).

La utilización de la biomasa de microalgas para la producción de biodiesel se debe a su gran capacidad de producción de lípidos, el contenido de lípidos en las microalgas se encuentra entre 1-70% del peso seco de la biomasa, dependiendo de la especie de microalga. El potencial de producción de biodiesel a partir de microalgas se ha reportado de acuerdo a su contenido lipídico, es decir, una microalga con un contenido del 30 al 70% (peso seco) de lípidos tiene un rendimiento de aceite de 58,700-136,900 L/ha (Chisti, 2007). De igual forma se ha informado que las microalgas pueden producir 150 veces más aceite que la soya (Satyanarayana, et al., 2011; Chisti, 2007).

Sin embargo, es preciso mencionar que el contenido de lípidos en las microalgas varía de especie a especie, además que el sistema de cultivo y el cosechado influyen en el contenido final de lípidos (Halim, et al., 2012). Dentro de su composición bioquímica los lípidos de las microalgas se clasifican en: neutrales (ácidos grasos libres), polares (fosfolípidos y glicolípidos), no polares, esteroides, éster de cera, derivados de prenil y derivados de pirrol (Clorofilas) (Patel, et al., 2017; Halim, et al., 2012). La obtención del biodiesel se realiza a partir de los lípidos neutros como son los triglicéridos, los cuales están constituidos por mono, di y triglicéridos, este grupo representa del 30-40% del contenido total de lípidos presentes en las microalgas (Mañá, et al., 2010). Se ha reportado que los ácidos grasos presentes en las microalgas pueden ser de carácter saturado o insaturado (uno o más dobles enlaces), y su cadena de carbonos se encuentra en un rango de 12 a 22 (Halim, et al., 2011).

Se conoce como biodiesel a cualquier combustible producido a partir de material biológico renovable equivalente al diésel (Ahmad, et al., 2011). El biodiesel se define como un combustible conformado por ésteres alquílicos de ácido graso (FAME, por sus siglas en inglés) de cadena larga de aceite vegetal o de grasas animales. El biodiesel tiene como ventajas: no presentar un aumento neto en la liberación de dióxido de carbono (CO_2), ser una energía renovable, biodegradable, no tóxica, libre de sulfuros y compuestos aromáticos, con un menor índice de emisiones de hidrocarburos policíclicos aromáticos, monóxido de carbono, dióxido de carbono, dióxido de azufre, partículas y humo, además de ser miscible con el diésel a diferentes proporciones. Sin

embargo, presenta un aumento en la emisión de óxido de nitrógeno (Fazal, et al., 2011; Yusuf, et al., 2011; Cho, et al., 2011; Murugesan, et al., 2009; Knothe & Razon, 2017). La principal desventaja del biodiesel es el costo de producción (Fazal, et al., 2011; Knothe, 2009).

Para la producción del biodiesel se han utilizado diferentes tipos de materias primas, entre las cuales destacan los aceites vegetales, grasas animales y aceites procesados. Diferentes aceites vegetales se pueden utilizar, como son: aceite de soya, girasol, colza y palma. De igual forma se han realizado estudios de producción del biocombustible a partir de semillas oleaginosas, por ejemplo: tabaco, pongamia, jatropha o semillas de caucho. Actualmente se ha estudiado el uso de diferentes cepas de microalgas como materia prima para la producción de biodiesel (Karmakar, et al., 2010).

En la Figura 1, se esquematiza el proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas, en dicha figura se pueden observar las principales etapas del proceso, las cuales son: cultivo de microalgas, cosechado de biomasa, pretratamiento, extracción de lípidos y producción del biodiesel a través de la transesterificación. A continuación, se describen las principales etapas involucradas en el proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas.

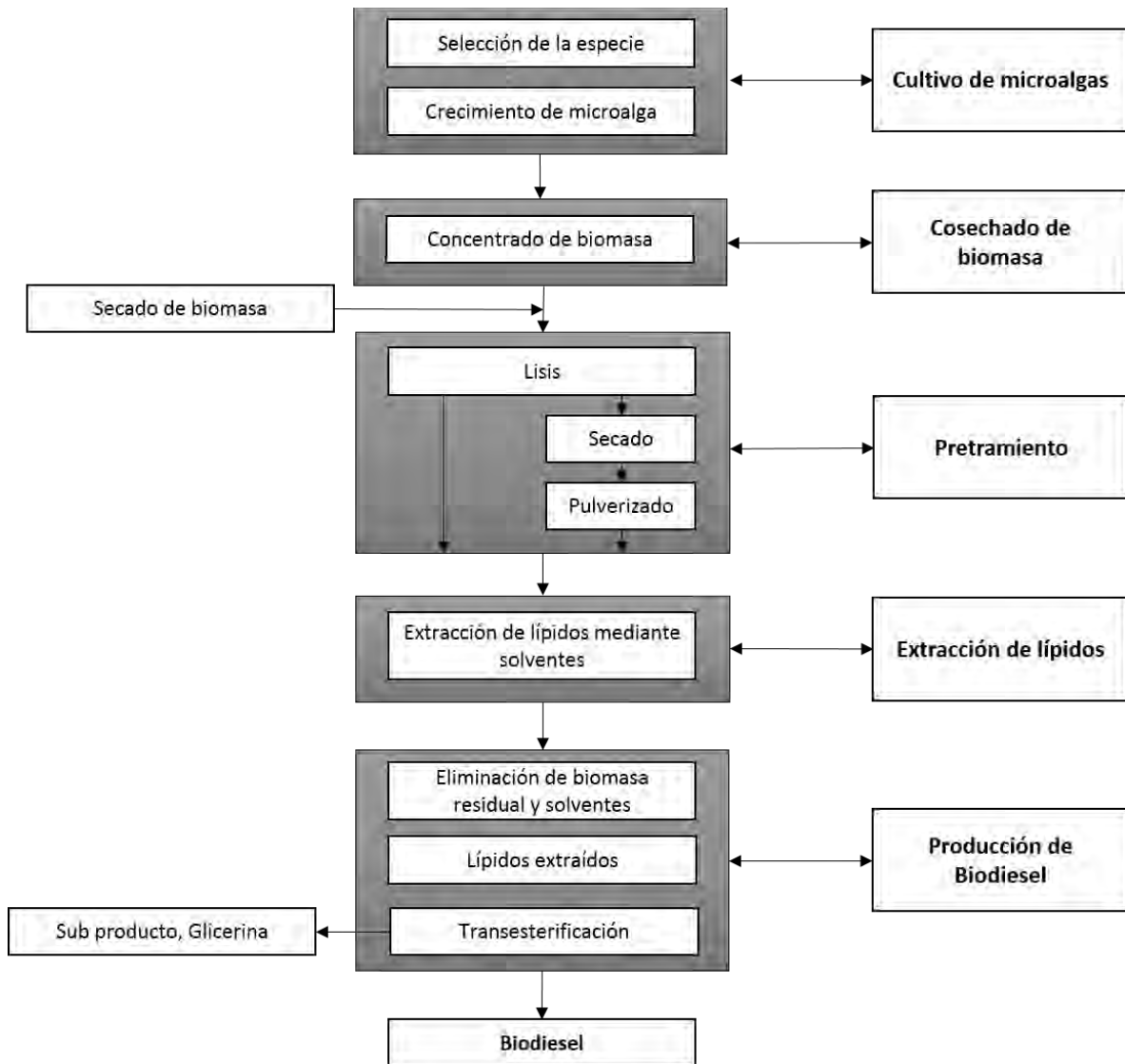


Figura 1 Esquema del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas (Rashid, et al., 2014; Halim, et al., 2012).

4.2 Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas es la etapa en la cual se busca el crecimiento de la biomasa. Existen diversos factores que influyen en el crecimiento de las microalgas como son: la luz, la concentración de nutrientes, la disponibilidad de dióxido de carbono (CO_2), el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto (ZHU, et al., 2013; Suali & Sarbatty, 2012; Behrens, 2005; Cai, et al., 2013).

El cultivo de microalgas se lleva a cabo mediante fotobiorreactores cerrados o abiertos. Los sistemas abiertos o estanques de pista de rodadura son comercialmente más comunes, por lo general se construyen mediante canales al aire libre de una profundidad de 15-30 cm. Sin embargo, pueden presentar diversos problemas como son: el control de las condiciones ambientales, la disponibilidad del CO_2 , la temperatura, la luz, el pH, la sedimentación de la biomasa, la contaminación de los cultivos y la presencia de depredadores. Dichos sistemas logran una producción de biomasa de 0.2-0.6 g/L y una productividad de 0.01-0.02 kg/m^2 día (ZHU, et al., 2013).

En contra parte los sistemas cerrados presentan una productividad 30 veces mayor que los sistemas abiertos (2-8 g/L, 0.02-0.45 kg/m^2 día), sin embargo, no son considerados para el cultivo masivo de microalgas (Chisti, 2007). Existen diversos tipos fotobiorreactores cerrados, por ejemplo: tubular, de columna y de placa plana; en la bibliografía se encuentran ampliamente reportados las configuraciones de los reactores (ZHU, et al., 2013). La eficiencia de producción de la biomasa mediante estos reactores se encuentra en la distribución de la luz sobre el área del reactor, favoreciendo el proceso de fotosíntesis de las microalgas. Este tipo de reactores no presentan contaminación por fuentes externas o pérdidas del medio de cultivo por evaporación. Sin embargo, su escalamiento está limitado por la longitud del tubo, debido al aumento de la concentración de oxígeno y al agotamiento del CO_2 a lo largo del reactor; de igual forma presentan problemas de ensuciamiento, de costos de producción y de mantenimiento.

4.2.1 Cultivo de microalgas a partir de aguas residuales

La producción de biocombustibles a partir microalgas presenta la problemática del cultivo de las mismas, ya que se requieren una gran adición de nutrientes para su desarrollo, es por ello que se ha reportado que la utilización de agua residual como medio de cultivo reduce los insumos del proceso (Cho, et al., 2013; Rawat, et al., 2011), debido a que ofrece como ventaja la presencia de nutrientes tales como: nitrógeno y fósforo para el desarrollo de la biomasa (Markou & Georgakakis, 2011).

El cultivo de microalgas en agua residual actúa como un tratamiento biológico, ya que se reduce la cantidad contaminantes en el agua, con la ventaja de producir biomasa, Tabla 1. Las microalgas absorben compuestos inorgánicos (macro y micro nutrientes), reduciendo la carga inorgánica y orgánica, además de remover metales pesados (tales como Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}) presentes en las aguas residuales (Markou & Georgakakis, 2011). De igual forma el cultivo de microalgas en agua residual se convierte en un tratamiento ambientalmente responsable y sostenible, debido a que no generan contaminantes secundarios (lodos), sino que mediante la recuperación de la biomasa se presenta el reciclado de nutrientes, la cual se puede utilizar

como materia prima para biocombustibles, elaboración de fertilizantes o alimento para animales (Rawat, et al., 2011; Pittman, et al., 2010).

Como se observa en la Tabla 1 se han utilizado una gran variedad de orígenes de aguas residuales, a través de las cuales se ha logrado obtener altos rendimientos de biomasa; de igual forma se reporta la remoción de nutrientes del agua residual, ya que las microalgas asimilan hasta el 96% de nitrógeno total y el 99% del fósforo total presente en el agua residual.

Las microalgas asimilan el nitrógeno para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; el nitrógeno es asimilado en forma de nitrato, nitrito, urea y amonio. Un déficit de este nutriente favorece la acumulación de lípidos. Por su parte, el fósforo es utilizado para la formación de trifosfato de adenosina (ATP), el cual es requerido por el alga para el almacenamiento de energía a corto plazo y de transferencia; el fósforo es asimilable en la forma de ortofosfatos; una deficiencia de fósforo conduce a una alta producción de oxígeno por parte de las microalgas (Pires, 2015).

Sin embargo, la utilización de aguas residuales como medio de cultivo, presenta la problemática de la variabilidad en la composición de los nutrientes, el cual se ve afectado por la variación estacional a lo largo del año (Markou & Georgakakis, 2011). Por otra parte, existen diversos factores en la composición del agua residual que inhibe el crecimiento de las microalgas, como son: altas concentraciones de amoníaco, cadmio, mercurio, bacterias patógenas o depredadores (Pittman, et al., 2010).

Tabla 1 Producción de biomasa y remoción de nutrientes a partir de agua residual.

Microalgas	Agua Residual	Rendimiento (g/L)	Productividad (mg/L d)	Remoción de contaminantes (%)				Referencia
				Nitrógeno total	Amonio	Fósforo Total	DQO	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Acuicultura	2.47	353.36	-	75.56	73.35	71.89	(Guldhe, et al., 2017)
<i>Cultivos mixtos de microalgas</i>	Industria Petrolera	-	4.11 g/m ² d	70-72	-	50-55	-	(Hodges, et al., 2017)
<i>Diferentes microalgas</i>	Purines de cerdo (Diluido)	1.14-1.8	-	90	-	80	73	(Wang, et al., 2016)
<i>Chlorella kessleri</i>	Municipales	2.7	-	96	-	99	-	(Caporgno, et al., 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>		2.91	-	95	-	98	-	
<i>Desmodesmus sp</i>	Digestión anaerobia (Diluida)	0.412	0.29	-	100	75.5	-	(Ji, et al., 2014)
<i>Cultivos mixtos de microalgas</i>	Municipales	0.36-0.58	13-17	55.4-83.9	-	30-60	-	(Komolafe, et al., 2014)

4.3 Cosecha de microalgas

La cosecha de microalgas es la etapa en la cual la biomasa es extraída del medio de cultivo. Se estima que la etapa de cosechado contribuye con el 20-30% del costo total de producción de biocombustibles. Se ha reportado que el costo del cosechado de microalgas para la producción viable de biocombustibles tiene que ser menor a 0.4-0.75 USD \$/Kg (Laamanen, et al., 2016).

La cosecha de microalgas se dificulta por su tamaño característico, por ejemplo, las algas eucariotas tienen un tamaño de 3-30 μm y las cianobacterias de 0.2-2 μm (Christenson & Sims, 2011). A ello se suma el inconveniente de la baja concentración de biomasa logradas en los cultivos, que son del orden de 200-600 mg/L (para sistemas abiertos), lo que implica procesar grandes volúmenes de cultivo. De igual forma se debe considerar la morfología, la motilidad y la materia orgánica extracelular de las microalgas (Henderson, et al., 2008).

Una característica importante que influye en la separación de la biomasa microalga es la estabilidad de las microalgas, esta atribuye a las interacciones eléctricas entre las microalgas y las partículas en suspensión del medio de cultivo (Tenney, et al., 1969). Un parámetro importante que se evalúa para el cosechado de las microalgas es la carga superficial de las microalgas a través de su potencial zeta. El potencial zeta (ζ) es un indicador del grado de repulsión entre las partículas cargadas en suspensión. Una alta magnitud del ζ (>25mV), significa una alta repulsión eléctrica entre partículas, favoreciendo una suspensión estable. Cuando el ζ es cercano a cero las partículas pueden acercarse unas con otras, hasta el punto donde son atraídas por fuerzas de van de Waals, favoreciendo así la aglomeración de las partículas (Vandamme, et al., 2012).

A las microalgas se les asocia un potencial zeta negativo, el cual puede variar de -2 a -75mV en función de los grupos funcionales químicos presentes pared celular de la microalga, de las condiciones de cultivo, la edad del cultivo y de la especie de microalga (Gerardo, et al., 2015). Por lo que las suspensiones de microalgas se comportan de acuerdo a un modelo disociación ácida, en el cual la carga superficial cambia a pH ácido.

La carga y la estabilización de los cultivos (suspensión) de microalgas son debido a la disociación o ionización de diversos grupos funcionales en la superficie de la célula, como son: carboxilos (-COOH) y grupos amino (-NH₂). Favoreciendo la repulsión electrostática entre partículas adyacentes y la estabilidad coloidal del sistema (Henderson, et al., 2008). La ionización es dependiente del pH, ya que los grupos carboxílicos se disocian y se cargan negativamente por encima de un pH de 4-5, por el contrario, los grupos amino sufren un decremento de la carga al mismo pH, Figura 2. Obteniéndose como resultado una carga negativa producida por el grupo carboxílico (Vandamme, et al., 2013). La carga superficial de las microalgas es negativa al pH natural del agua (Gregory, 2006).

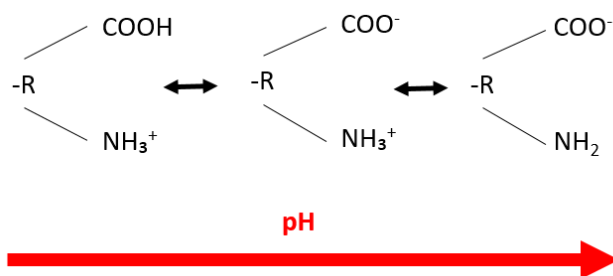


Figura 2 Ionización de los grupos funcionales ubicados en la superficie de la microalga en función del pH. Para las microalgas el punto de carga cero se encuentra a pH de 4-5 (Gregory, 2006).

Estudios donde se evalúa el potencial zeta de *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo, encontraron que en función del pH de la muestra (2-9) se obtenía un decremento en el ζ de +15 a -20mV. De igual forma se reportó que grupos funcionales carboxílicos, fosforilo, amina e hidroxilo se encontraban en la pared de la microalga (Hadjoudja, et al., 2010). Por su parte Zhang (2012) reportó un decaimiento en el valor neto del ζ en función de la fase de cultivo, tomando en cuenta una fase exponencial (-20.6mV), estacionaria (-13.2mV) y decaimiento (-12.2). (Zhang, et al., 2012)

4.3.1 Métodos de cosecha

La selección del método depende de las características y la densidad celular del cultivo de microalgas. Chen (2011) sugiere que un sistema de cosecha óptimo es aquel que pueda funcionar con diversas especies de microalgas, que utilice la menor cantidad de productos químicos y el menor consumo energético, y que además facilite la liberación de material intracelular (Chen, et al., 2011; Barros, et al., 2015).

Las técnicas disponibles son la sedimentación, centrifugación, coagulación-floculación, filtración, flotación y técnicas eléctricas (Gerardo, et al., 2015; Chen, et al., 2011). La cosecha se divide en dos etapas de proceso (Brennan & Owende, 2010; Barros, et al., 2015):

1. Recolección a granel: Tiene como propósito separar la biomasa del cultivo, logrando una concentración de materia sólida del 2-7% (factor de concentración de 100-200); típicamente se utiliza floculación, flotación o sedimentación.
2. Concentrado: Tiene como objetivo concentrar la recolección a granel hasta obtener concentraciones de materia sólida superiores al 15-25% (factor de concentración de 2-10), se utiliza filtración y centrifugación; proceso de alto requerimiento energético.

Los métodos mecánicos son considerados más eficaces y por lo tanto son los más utilizados para la cosecha de microalgas, sin embargo, estos necesitan de una etapa previa en la que se utilice una sustancia química (coagulante) para facilitar la recolección.

La Tabla 2 resume los principales métodos de cosecha de microalgas reportados y sus principales características. Los procesos presentados tienen diferentes eficiencias de recuperación y concentración de sólidos final; destaca que los métodos con mayor eficiencia de recuperación no son los que consumen mayor energía. Sin embargo, los procesos que logran mayores concentraciones de sólidos al final de proceso si están ligados a un mayor consumo energético. Una mayor cantidad de sólidos favorece las etapas posteriores del proceso de producción de biocombustibles, es por ello que el método de cosecha debe ser investigado en forma integral.

Tabla 2 Resumen de los métodos para cosecha de biomasa microalgal

Métodos de cosecha	Concentración sólidos (%)	Eficiencia de recuperación	Consumo energético (kWh/m ³)	Observaciones	
Sedimentación	0.5-3	10-90%	0.1 (para lograr una concentración de 1-3% SST)	<ul style="list-style-type: none"> Método sencillo y de bajo costo Diseños nuevos para mejorar el proceso 	<ul style="list-style-type: none"> Prolongados tiempos de operación Deterioro de la biomasa
Centrifugación	12-22	80-90% (2-5min operación)	8	<ul style="list-style-type: none"> Apta para diferentes especies de microalgas Alta eficiencia de recuperación Tiempos cortos de operación 	<ul style="list-style-type: none"> Método costoso Alto consumo energético Daño de la biomasa
Filtración (Microfiltración)	5-27	95%	0.9-2.23	<ul style="list-style-type: none"> Alta recuperación Reducción del consumo energético en un 80-95%, comparado con la centrifugación 	<ul style="list-style-type: none"> Ensuciamiento de la membrana Alto costo de operación
Floculación/ Coagulación	10-60	≥80%	Bajos requerimientos para el mezclado lento	<ul style="list-style-type: none"> Método sencillo y rápido 	<ul style="list-style-type: none"> Floculantes químicos pueden ser costosos y tóxicos Contaminación de biomasa por el uso de floculantes o aditivos

Métodos de cosecha	Concentración sólidos (%)	Eficiencia de recuperación	Consumo energético (kWh/m ³)	Observaciones	
Flotación por aire disuelto	3-6	50-90%	7.6	<ul style="list-style-type: none"> • Factible para aplicaciones a gran escala • Bajo costo • Requerimientos limitados de espacio • Tiempos de operación cortos 	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de floculantes • No apto para algas marinas
Ultrasonido	---	90-92%	Alto consumo energético	<ul style="list-style-type: none"> • Sonificación, altos porcentajes de recuperación en periodos cortos de tiempo • Ruptura celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de los metabolitos (lípidos) al medio acuoso
Métodos eléctricos	---	95%	0.2-2.28	<ul style="list-style-type: none"> • No requieren adición de productos químicos • Trabaja a pH natural 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor consumo de energía y de floculante por muestras de agua salina • Problemas de escalado, debido al costo de los equipos
Ozono flotación	1-20	>70%	1.83-9.7	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere la adición de coagulantes • Ruptura celular • Liberación de tensoactivo natural 	<ul style="list-style-type: none"> • Experiencia a nivel laboratorio • Alto consumo energético, asociado a la biomasa procesada

Adaptado de Rodríguez, 2015; Barros, et al., 2015; Gerardo, et al., 2015; Nava, et al., 2017; Nava, 2015; Pragma, et al., 2013; Chen, et al., 2011; Uduman, et al., 2010; Christenson, et al., 2011.

4.3.2 Métodos de cosecha convencionales

La densidad y el radio de la célula influyen en la velocidad de sedimentación de las microalgas, la cual se encuentra reportada entre 0.016-0.09 m/h (Gerardo, et al., 2015). Como resultado de las bajas velocidades de sedimentación se produce el deterioro de la biomasa por los tiempos prolongados de retención. El proceso de sedimentación se ve favorecido con la utilización de coagulantes.

La centrifugación utiliza la fuerza centrífuga para separar sólidos y líquidos. La separación depende del tamaño de la partícula y de la densidad del medio (Uduman, et al., 2010), demanda altos consumos de energía (8kWh/m³). En pruebas de laboratorio se encontró que se requiere una velocidad de 500-1000xg, durante 2-5min para lograr una concentración final de sólidos del 80-90% (Chen, et al., 2011).

A través de la adición de agentes químicos (floculantes) se busca formar partículas de mayor tamaño (flocs) que sedimenten. La floculación es un proceso que se puede combinar con otras técnicas de cosechado como la flotación o la sedimentación. La desventaja es que algunos floculantes químicos pueden ser costosos y tóxicos. Una variante de este método es la auto-floculación, en la cual se lleva a cabo la aglomeración de las microalgas sin la adición de coagulantes a pH > 9. Un aumento de pH provoca la saturación iones calcio y fosfato, dando como resultado la formación de precipitados de fosfato de calcio con carga positiva que neutralizan la carga negativa de las microalgas (Gerardo, et al., 2015). Tiempos prolongados de cultivo expuestos a luz solar y limitación de CO₂, favorecen la auto-floculación (Chen, et al., 2011). Estudios de auto-floculación con *Dunaliella tertiolecta* reportan una recuperación del 90% de la biomasa total a un pH entre 8.6-10.5 (Horiuchi, et al., 2003).

La coagulación-floculación es considerada como el principal método de cosechado de microalgas, se ha utilizado para cosechar diferentes especies de microalgas. Dicho proceso tiene la capacidad de concentrar la biomasa de 20-100 veces (Barros, et al., 2015). La coagulación-floculación está definida como la coalescencia de partículas finamente divididas en suspensión sobre agregados más grandes seguido por la aglomeración de éstas en floculos que se depositan en el fondo del recipiente, dejando un sobrenadante claro (Barros, et al., 2015). Debido a la carga negativa de la microalga se prefieren coagulantes de carácter catiónico. Se han utilizado coagulantes como cloruro férrico, sulfato de aluminio y sulfato de hierro. La disociación de estas sales reduce la repulsión electrostática del cultivo permitiendo la formación de aglomerados, este proceso es seguido por una etapa de sedimentación. Con este método se pueden lograr altas eficiencias de recuperación, sin embargo, la adición de coagulantes depende de la condición de los cultivos y pueden requerirse grandes cantidades de dichas sales metálicas; tomando en cuenta que representa entre 4-7% del costo del proceso general, lo que incrementa el precio neto del proceso (Barros, et al., 2015).

La coagulación alcanza una eficiencia de recuperación de hasta el 99%, por ejemplo, para la recuperación de *Chlorella vulgaris* cuando se utilizó como coagulante Mg-APTES a una dosis de 1g/L, caso contrario se alcanzó un 92% de eficiencia cuando se utilizó quitosano a una dosis de 30mg/L para el mismo género (Barros, et al., 2015).

La filtración es un método de cosecha apropiado para microalgas con tamaños entre 30-70 μm . Se pueden obtener altas eficiencias de recuperación (80-90%), pero se requiere del consumo de energía debido a las condiciones de presión a las que operan los sistemas de filtración. La microfiltración y la ultrafiltración se han empleado para recuperar microalgas con tamaños menores a los 30 μm . En general, la filtración es una técnica sostenible para la cosecha de microalgas cuando se tienen colonias de gran tamaño, sin embargo, es un proceso que aún no se aplica a gran escala (Barros, et al., 2015). Para el procesamiento de pequeños volúmenes de cultivo (<2m³/día), la filtración con membrana puede ser más rentable que la centrifugación; se pueden tener ahorros en el consumo de energía hasta en un 80-90%. No obstante, debido al costo asociado al reemplazo de las membranas y el bombeo a mayores escalas de producción (>20 m³/día), la centrifugación puede ser un método de cosecha más económico. Con este método se han obtenido fluidos 245 veces más concentrados que el cultivo original, produciendo un lodo con 27% de sólidos, cuando se ha cosechado la microalga *Coelastrum* sp (Brennan & Owende, 2010).

Con respecto a los métodos eléctricos, estos se aplican a diversos tipos de microalgas y consiste en la aplicación de un campo eléctrico al cultivo para separar las células de las microalgas que se encuentran cargadas negativamente. Las microalgas pueden depositarse en los electrodos mediante electroforesis o sedimentar a través de electro-floculación (Barros, et al., 2015). Las eficiencias de recuperación son altas y la energía invertida en el proceso es relativamente baja comparada con la centrifugación, similar al que se emplea en la filtración. La desventaja de estos métodos es el escalamiento del proceso debido a los costos de los equipos.

4.3.3 Flotación de microalgas

La flotación por su parte es un proceso donde se utiliza la gravedad para llevar cabo la separación y en el cual una corriente de burbujas de gas se introduce en un medio acuoso con presencia de partículas sólidas (microalgas) para llevarlas a la superficie. La flotación es un proceso de probabilidades: la colisión burbuja-partícula y la adhesión burbuja-partícula después de la colisión; por lo tanto, la baja estabilidad de una partícula producirá un mejor contacto con las burbujas de aire, por lo tanto, partículas de tamaños pequeños son levitados a la superficie (Show & Lee, 2014). La flotación al igual que la centrifugación o la coagulación necesitan que la microalga se encuentre desestabilizada, esto es debido a que las burbujas y las microalgas se encuentran cargadas negativamente, favoreciendo así la repulsión entre estas; es por ello que en muchas ocasiones la flotación se acompaña con el uso de coagulante o tensoactivo (Phoochinda & White, 2003).

Con la flotación se puede separar partículas de diámetro menor a 500 μm (Chen, et al., 2011). Las partículas en suspensión deben ser hidrófobas para unirse a las burbujas de gas (Hanotu, et al., 2012). En función del tamaño de la burbuja de aire la flotación se puede dividir en: flotación por aire disuelto (DAF) y flotación por aire disperso (DiAF).

- I. El DAF implica la presurización de una corriente de agua que es saturado con aire para producir burbujas de un tamaño de 10-100 μm .
- II. El DiAF implica burbujas de tamaño de 700-1500 μm , formadas por un agitador mecánico o a través de la inyección de aire en un medio poroso.

Los parámetros de influencia para la flotación son: la tasa de reciclaje, la presión del tanque, tiempo de retención hidráulico, el tamaño de burbuja y la tasa de burbujas (Uduman, et al., 2010). La flotación es proceso escalable (Hanotu, et al., 2012) para la cosecha de microalgas, la flotación es un proceso que se ve favorecido por la flotación natural de las microalgas y el floculo de baja densidad que se forma en la coagulación (Henderson, et al., 2009). De igual forma, se ha reportado que el uso de la flotación como método de cosecha es más eficiente en un 15-20% al ser comparado con la centrifugación (Henderson, et al., 2008). Por su parte, el éxito de la flotación depende del diámetro mínimo de la partícula (10-30 μm) y de la carga superficial que se acerque a cero (potencial zeta aproximado a -15 a 0 mV) (Henderson, et al., 2008) garantizando así una eficiencia de colisión partícula-burbuja.

Se ha reportado que la flotación como método de cosecha de microalgas presenta un porcentaje de recuperación de la biomasa del 90-99% (Phoochinda & White, 2003). Cheng et al, (2010, 2011) reportaron que la flotación con aire de un cultivo de microalgas no produjo la separación de las microalgas, caso contrario cuando se utilizó como gas de dispersión al ozono. Por otra parte, Coward et al. (2013) logro llevar a cabo la separación de microalgas a través de flotación dispersa utilizando como surfactante CTAB, el autor reporta que su proceso logró concentrar la concentración inicial de la biomasa en 230 veces, cuando se utiliza una concentración de 10mg/L de tensoactivo. Encontrando que el surfactante favorece la recuperación de lípidos al producir lisis en la microalga (60.12% de los lípidos totales), comparado con el proceso de centrifugación (58.30% de los lípidos totales).

La flotación ozono en un método que ha llamado fuertemente la atención cómo método de cosecha de microalgas para la producción de biocombustibles y metabolitos de interés, recientemente se ha iniciado investigación a nivel internacional para considerar este proceso. A continuación, se detallan los avances en el proceso de cosechado de microalgas por ozono flotación.

4.3.4 Ozono flotación de microalgas.

El uso del ozono como método de cosecha de microalgas (ozono flotación), surge del trabajo de diferentes autores que han evaluado el efecto del ozono como una medida de eliminación de estos microorganismos; los cuales proliferan en cuerpos de agua eutrofizadas. Las microalgas como fuente de contaminación excretan diversos metabolitos (por ejemplo, geosmina, 2 metilisoborneol y alcoholes alicíclicos) que conceden un aroma y sabor característico al agua, además que las cianobacterias excretan toxinas. Cuando se desean eliminar a través de filtración, producen taponamiento (Nguyen, et al., 2013; Miao & Tao, 2009; Plummer & Edzwald, 2002; Langlais, et al., 1991).

Henderson, et al., (2008) reportaron la eliminación de las microalgas por efecto de la oxidación a través de cuatro mecanismos, los cuales son: 1) daño en la morfología celular externa de la microalga, 2) el movimiento de microalgas con flagelos, 3) excreción de compuestos que favorezcan la aglomeración de las microalgas (por ejemplo, quitina) y 4) la materia orgánica extracelular excretada afecta el proceso de floculación.

La ozonación es un método en donde se combinan las propiedades oxidantes del ozono con el proceso de flotación para la separación de partículas suspendidas en agua. El proceso de ozonación es considerado como una etapa de pre tratamiento, teniendo por objetivo la reducción de la carga en el resto del tren de tratamiento (Bourbigot & Faivre, 1986).

Durante el cultivo de las microalgas, las células se encuentran cargadas negativamente, para llevar a cabo la cosecha de microalgas primero éstas deben ser desestabilizadas para ser separadas del medio acuoso. A través de la utilización de ozono se obtiene la disminución del potencial zeta de las partículas, incluidas las microalgas, favoreciendo la formación de aglomerados de biomasa al momento de la cosecha (Langlais, et al., 1991), Figura 3. En el caso específico de las microalgas, Nguyen et al. (2013), reportó la disminución del potencial zeta de las microalgas de -18 a -14mV a 30 minutos de exposición de ozono.

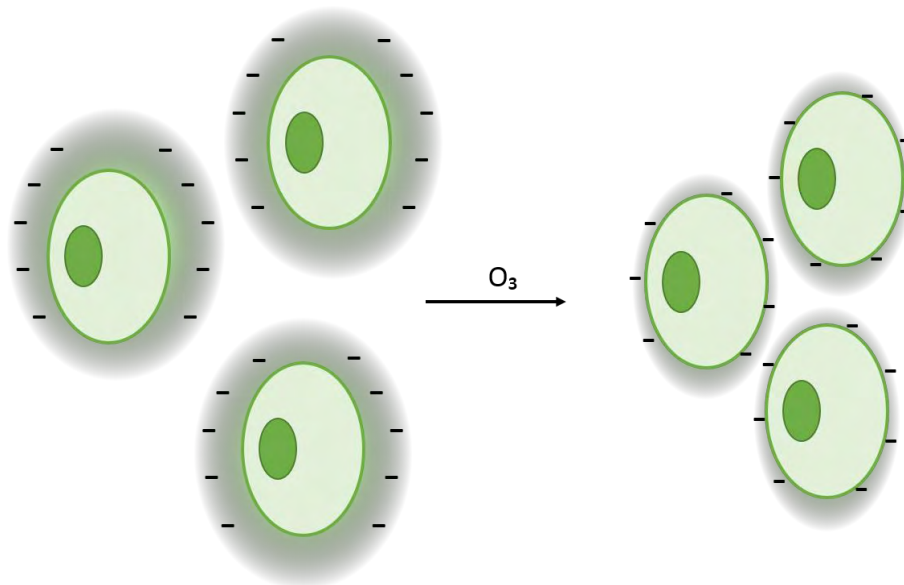


Figura 3 Efecto del ozono en la desestabilización de células de microalgas, adaptado de Langlais et al, (1991).

Por otra parte, el ozono al ser un oxidante, ataca la membrana celular, produciendo lisis de las células de las microalgas (Cardeña, et al., 2017), dando lugar a la liberación de biopolímeros (ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos) que funcionan como coagulantes naturales, Figura 4. Por otra parte, se ha observado que algunos de estos polímeros naturales presentan actividad superficial, lo cual explica la formación de espuma en diversas plantas de tratamiento. Dicha espuma se relaciona con la concentración de algas y su formación es catalizada por la presencia de ozono (Langlais, et al., 1991). Datos limitados sugieren que la materia extracelular de algas puede estabilizar las partículas naturales (Cheng, et al., 2010; Miao & Tao, 2009; Langlais, et al., 1991).

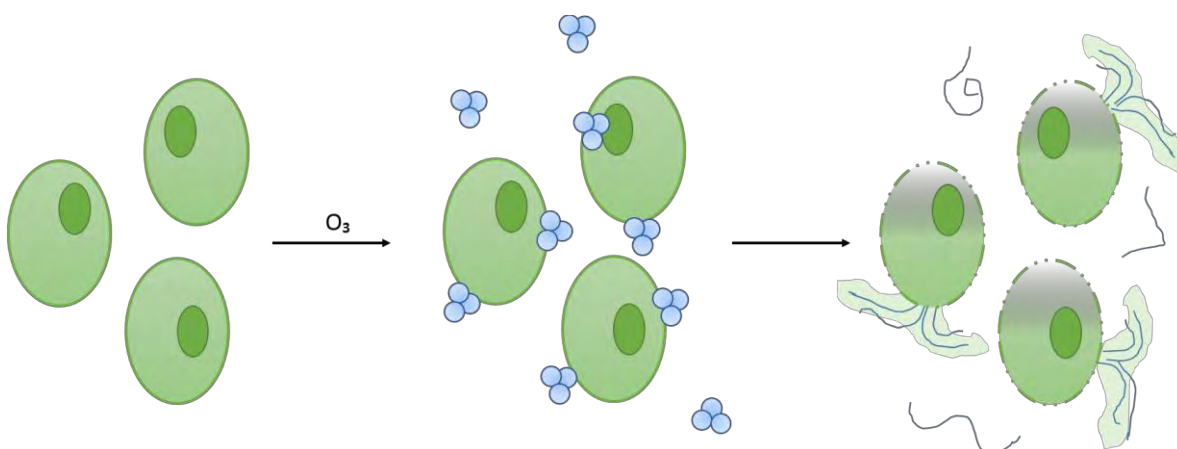


Figura 4 Liberación de material intracelular causado por la lisis celular que produce el ozono, adaptado de Langlais et al. (1991).

Para el proceso de ozono flotación se han reportado diferentes casos de estudios (Tabla 3), dentro de estos estudios destaca el establecimiento de las condiciones de operación del proceso de cosechado, el efecto del ozono en las macromoléculas presentes en las microalgas (proteínas, lípidos y carbohidratos) y en el balance energético para la producción de biodiesel y biogás.

Es preciso mencionar que existe bibliografía que reporta a la ozono flotación como una medida de potabilización de agua proveniente de una fuente artificial con problemas de presencia de microalgas, por ejemplo, Betzer et al. (1980) y Benoufella et al. (1994). A partir del 2010 pocos artículos de ozono flotación son dirigidos a la recuperación de la biomasa, dentro de estos estudios, se ha reportado que la dosis de ozono aplicada para llevar a cabo la cosecha de las microalgas es una condición de la concentración de biomasa y del tipo de microalga (Cheng, et al., 2010), es por ello que existe una diversidad en los resultados obtenidos para el proceso. A este proceso se le atribuyen altas eficiencias de recuperación de los sólidos suspendidos, se reportan porcentajes de recuperación mayores del 70% de la concentración de microalgas.

Estudios recientes, demostraron que la ozono flotación se favorece con el aumento de la concentración inicial de la muestra de biomasa a separar, disminuyendo así la dosis de ozono empleada para la separación de la biomasa (Orta Ledesma de Velásquez, et al., 2017). Por su parte, Alves et al. (2018) reportaron el uso de la flotación con ozono para la cosecha de *Scenedesmus sp.* cultivada en agua residual, los autores reportan el 62% de la biomasa cosechada, además de la recuperación del 30% de lípidos y carbohidratos presentes en la biomasa.

Tabla 3 Casos de estudio para la ozono flotación como método de cosecha.

Referencia	Muestra	Dosis de ozono aplicada (mgO ₃ /mgBiomasa)	Resultado
Betzer, et al., 1980	Algas obtenidas del efluente de una laguna de oxidación	15-50mg/L	98% Remoción de los sólidos suspendidos
Benoufella, et al., 1994	<i>Microcystis aeruginosa</i> (medio de cultivo)	0.055-2mg/L	Reducción de la turbiedad y algas
Cheng, et al., 2010	<i>Chlorella vulgaris</i> (medio de cultivo)	0.005-0.03	98% Remoción de turbiedad Aglomeración de células (50µm)
Cheng, et al., 2011	<i>Scenedesmus obliquus</i> FSP-3 (medio de cultivo)	0.2-0.5	95% Remoción de turbiedad Aglomeración de células (10-50µm)
Valeriano, 2013	Cultivo mixto de microalgas (cultivo en agua residual)	0.13	Liberación de proteínas tensoactivas durante el proceso 100% Remoción de sólidos
Komolafe, et al., 2014	<i>Desmodesmus sp</i> y cultivo mixtos con cianobacterias (cultivo en agua residual)	0.517	Evaluación del efecto del ozono en el perfil de ácidos grasos
Velásquez-Orta, et al., 2014	Cultivo mixto de microalgas (cultivo en agua residual)	0.23	97.9% Remoción de turbiedad 79.6% Remoción de sólidos suspendidos Concentración de la biomasa 48 veces la inicial
Nava, 2015	Cultivo mixto de microalgas (cultivo en agua residual)	---	Balance de energía para el proceso de ozono flotación (77% del consumo total de energía)
Rodríguez, 2015	<i>Scenedesmus sp</i> (cultivo en agua residual)	0.047	70% Recuperación de microalgas

Orta Ledesma, et al., 2017	<i>Scenedesmus</i> sp (cultivo en agua residual)	0.05	Rendimiento de recuperación de biomasa de 21.12 mg Biomasa/mg O ₃
Alves, et al., 2018	<i>Scenedesmus</i> sp (cultivo en agua residual)	0.16	62% Recuperación de biomasa Cuantificación de macromoléculas en la biomasa Evaluación de la calidad del efluente del proceso de ozono flotación

Durante el proceso de flotación con ozono se forma una espuma a través de la cual se lleva a cabo la recuperación de la biomasa, Cheng et al. (2010, 2011) atribuye dicha formación de espuma a la liberación de proteínas totales de microalgas que actúan como tensoactivos favoreciendo la formación de espuma. Sin embargo, no se ha establecido una relación entre la proteína total liberada y la recuperación de la biomasa microalgal.

Las proteínas son consideradas como tensoactivos naturales, tiene la capacidad de reducir la tensión superficial del agua (72mN/m) hasta 45mN/m (Foegeding, et al., 2006). Para el caso específico de proteínas de microalgas se reporta un abatimiento de la tensión superficial del agua hasta 37.5mN/m (proteínas extraídas con método alcalino) (Chronakis, et al., 2000).

Por otra parte, cabe destacar el efecto de la cosecha por ozono flotación en la lisis de la microalga, la lisis producida por el ozono favorece la extracción de metabolitos de interés, produciendo así un pretratamiento en la biomasa facilitando la extracción, en este caso específico de lípidos. Actualmente existen diferentes métodos para llevar a cabo el pretratamiento (ruptura celular) de las microalgas (Tabla 4), los cuales consisten en el acondicionamiento de la biomasa. Este proceso es necesario, ya que aumenta la eficiencia de etapas posteriores dentro del tren de producción de biocombustibles. Es sabido que la composición de la pared celular de las microalgas es una función de la especie, es por ello que existe una gran diversidad en el consumo energético producido por el pretratamiento (Gunerken, et al., 2015).

Como se observa en la Tabla 4, el consumo energético del acondicionamiento de la biomasa es función del método y de la microalga utilizada. Sin embargo, dentro del balance de energía del proceso de producción, se debe considerar el gasto energético de la etapa; es por ello que los métodos de cosecha que favorezcan la ruptura celular de la microalga, permitirá un ahorro de energía.

Se ha reportado que el uso de la ozono flotación como método de cosecha, actúa como un pretratamiento, ya que favorece la recuperación de las biomoléculas presentes en las microalgas. Velásquez-Orta et al. (2014) reportó un incremento en la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME; por sus siglas en inglés) del 100%, aplicando una dosis de ozono para la cosecha de 0.12-0.23 mg O₃/mg Biomasa, el resultado fue comparado con el método de cosechado por centrifugación, el cual, obtuvo un porcentaje de recuperación de 2.35-5.85%.

Tabla 4 Comparación de los métodos de ruptura celular para extracción de metabolitos (Gunerken, et al., 2015).

Método de ruptura celular	Microalga	Interrupción de la pared celular (%)	Energía consumida (kWh/Kg Biomasa)
<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizadores de alta presión Ultra sonificación 	<i>Chlorococcum sp</i>	0.85	146.94
<ul style="list-style-type: none"> Microondas con solventes 	<i>Scenedesmus sp</i>	7.5	36.67
<ul style="list-style-type: none"> Microondas 	<i>Botryococcus sp,</i> <i>Chlorella sp,</i> <i>Scenedesmus sp</i>	0.5	2.67
<ul style="list-style-type: none"> Microondas Baño de agua Tratamiento láser Homogeneizadores de alta velocidad 	<i>Nannochloropsis oculata</i>	0.14	116.67
<ul style="list-style-type: none"> Molienda con perlas Homogeneizadores de alta presión 	<i>Chlorella sp</i>	3.5	17.26
<ul style="list-style-type: none"> Pulsos eléctricos 	<i>Isocrysis sp</i>	15	4.67
<ul style="list-style-type: none"> Ultrasonido 	---	25	3.7
		15	0.125
			10
			0.25
			0.007
			0.06

De igual forma Komolafe et al. (2014) reportó la utilización de la ozono flotación para la cosecha de un cultivo mixto microalgas-cianobacterias, el uso de la flotación con ozono presentó un mayor rendimiento de recuperación de lípidos del 16.08%, comparado con 14.29% obtenido por centrifugación. Por otra parte, dicho autor reportó que los ácidos grasos de la muestra que estuvieron en contacto con ozono presentaban un mayor porcentaje de FAME saturados (51.85%), que las muestras cosechadas por centrifugación (46.96%), el autor menciona que dicho resultado favorecerá la estabilidad oxidativa del biocombustible (biodiesel). Por otra parte, estudios donde se caracterizaron aceites vegetales (oliva y soya) ozonados, mostraron que las cadenas de grasa tenían un menor grado de insaturación en función del tiempo de oxidación (Sadowska, et al., 2008). Debe tenerse en cuenta que los esquemas de oxidación varían en función de la composición de los ácidos grasos insaturados presentes, teniendo como resultado diversos productos de oxidación (Cunha, et al., 2011).

Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio del efecto del ozono como método de ruptura celular, debido a que un exceso de ozono podría afectar negativamente la recuperación de lípidos, ya sea modificándolos a compuestos químicos de poco interés o la pérdida, de éstos al ser liberados al medio acuoso, dificultando su recuperación.

4.3.5 Interacción del ozono con lípidos.

El ozono es un fuerte agente oxidante que reacciona generalmente con compuestos que contienen enlaces dobles o triples carbono-carbono. Los ácidos grasos son compuestos saturados o insaturados, que presentan enlaces: $-\text{CH}=\text{CH}-$, dentro de su cadena de hidrocarburos (Kadesch, 1963). De manera general el ozono reacciona con los lípidos de cadena insaturada para formar ozónidos y subsecuentemente radicales libres, finalmente productos estables como son los hidroperóxidos. Por su parte, los radicales libres son capaces de iniciar la peroxidación lipídica obteniendo como resultado la formación de malondialdehído, hidrocarburos y aldehídos, Figura 5, (Roshchina & Roshchina, 2003).

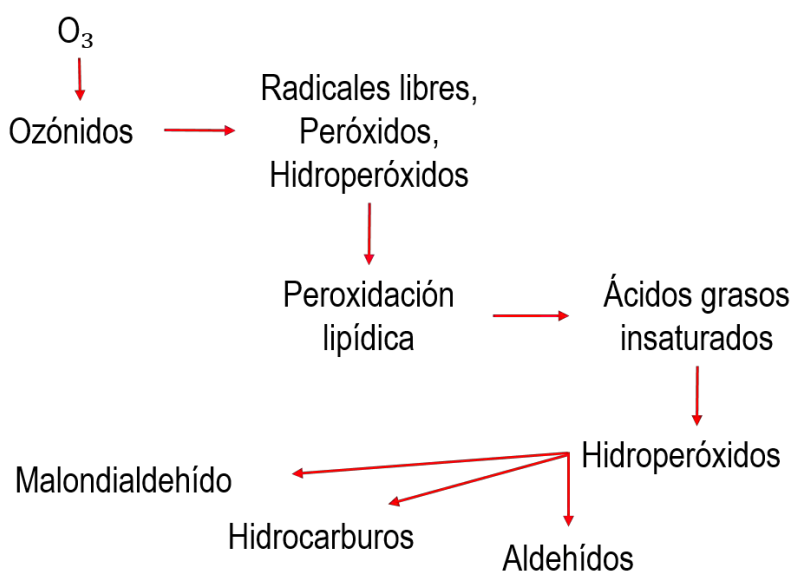


Figura 5 Esquema de interacción del ozono con los lípidos, (Roshchina & Roshchina, 2003).

La reacción del ozono con olefinas, las cuales contienen dobles enlaces se describen por el mecanismo de Criegee (Cunha, et al., 2011; Soriano, et al., 2003; von Sonntag & von Gunten, 2012; von Gunten, 2003).

El ozono reacciona con los dobles enlaces de los ácidos grasos presentes en la microalga. Cunha et al. (2011) presenta la reacción del ozono con el ácido linoleico (cis 9, 12 octadecadienoico ácido; $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$), Figura 6. La reacción del ozono con los dobles enlaces del ácido graso, producen la formación de un ozónido (compuesto inestable), el cual en presencia de agentes oxidantes se convierte en ácidos carboxílicos. En este caso ácido malónico, ácido hexanoico y éster monometílico de ácido azelaico.



Figura 6 Reacción de ozonólisis del ácido linoleico (Cunha, et al., 2011).

El ozono induce la reacción de peroxidación de lípidos debido a que genera radicales libres (OH^\bullet) a pH básico. La peroxidación conduce a la pérdida de ácidos grasos semi-oxidados, consumo de oxígeno y acumulación de hidroperóxidos (Roshchina & Roshchina, 2003).

Por otra parte, el biodiesel es un biocombustible compuesto por ésteres metílicos de ácidos grasos, que a diferencia del combustible Diesel y el etanol presentan una alta resistencia a la oxidación natural, es por ello que éstos se pueden almacenar tiempos prolongados. Por su parte el biodiesel es susceptible a degradarse a condiciones ambientales (Cunha, et al., 2011).

Una característica particular del biodiesel es su estabilidad oxidativa, la cual está definida como la susceptibilidad a la oxidación y/o auto oxidación durante el almacenamiento a través del tiempo (Yaakob, et al., 2014), la estabilidad oxidativa está ampliamente ligada con la composición de ácidos grasos insaturados. Es sabido que a mayor grado de insaturación del ácido graso la estabilidad del combustible disminuye. Se ha reportado que el uso de la ozono flotación como método de cosecha favorece la obtención FAME saturados lo cual favorece la calidad oxidativa del combustible (Komolafe, et al., 2014).

Por otra parte, Nava (2015) realizó el balance de energía para la producción de biodiesel y biogás a partir de microalgas cosechadas por ozono flotación, encontrando que el consumo energético asociado a la etapa de cosechado representaba el 70% (9.1 kWh/m^3) del gasto energético total. De igual forma, el autor reportó que, para el caso de la producción de biodiesel, es posible disminuir dicho valor energético hasta 1.83 kWh/m^3 en función al contenido lipídico de la microalga (Nava, et al. 2017). Comparando la ozono flotación con otros métodos de cosecha en función a su consumo energético, la ozono flotación se encuentra ligeramente superior a la centrifugación (8 kWh/m^3) y la flotación por aire disuelto (7.6 kWh/m^3). Dentro del valor energético de la ozono flotación, se debe considerar el efecto positivo en las etapas posteriores del tren de producción de productos de alto valor agregado, como es la eliminación de una etapa de pretratamiento (ruptura de la pared celular) y en el mejoramiento de la calidad oxidativa del biocombustible.

La bibliografía reporta, la relación de energía neta (NER, por sus siglas en inglés) para la producción de biocombustibles a partir de microalgas entre 0.3-3.33, la diferencia entre los valores radica en el proceso de

producción establecido y en los productos finales. Los factores que influyen son: (1) la fuente de dióxido de carbono, (2) la fuente de nutrientes, (3) la asignación de productos y co-productos, (4) la extracción y procesamiento de la biomasa y (5) producción de la biomasa (Weschler, et al., 2014).

Nava (2015, 2017) obtuvo un NER de 1.17 para la producción biodiesel tomando en cuenta un contenido lipídico de microalgas de 10-20% y la valorización de la biomasa residual para producir gas metano. De igual forma reportó que la concentración de la biomasa utilizada durante el proceso de cosechado afecta el consumo energético asociado al sistema.

4.3.6 Interacción del ozono con proteínas.

Por otra parte, cuando las proteínas o los aminoácidos son expuestos al ozono experimentan transformaciones oxidantes en diferentes grados (Figura 5), los principales aminoácidos en reaccionar son: triptófano, tirosina, histidina y cisteína. La cisteína y cistina son más susceptibles a la oxidación debido a la presencia del grupo thiol ($-\text{SH}$) (Roshchina & Roshchina, 2003).

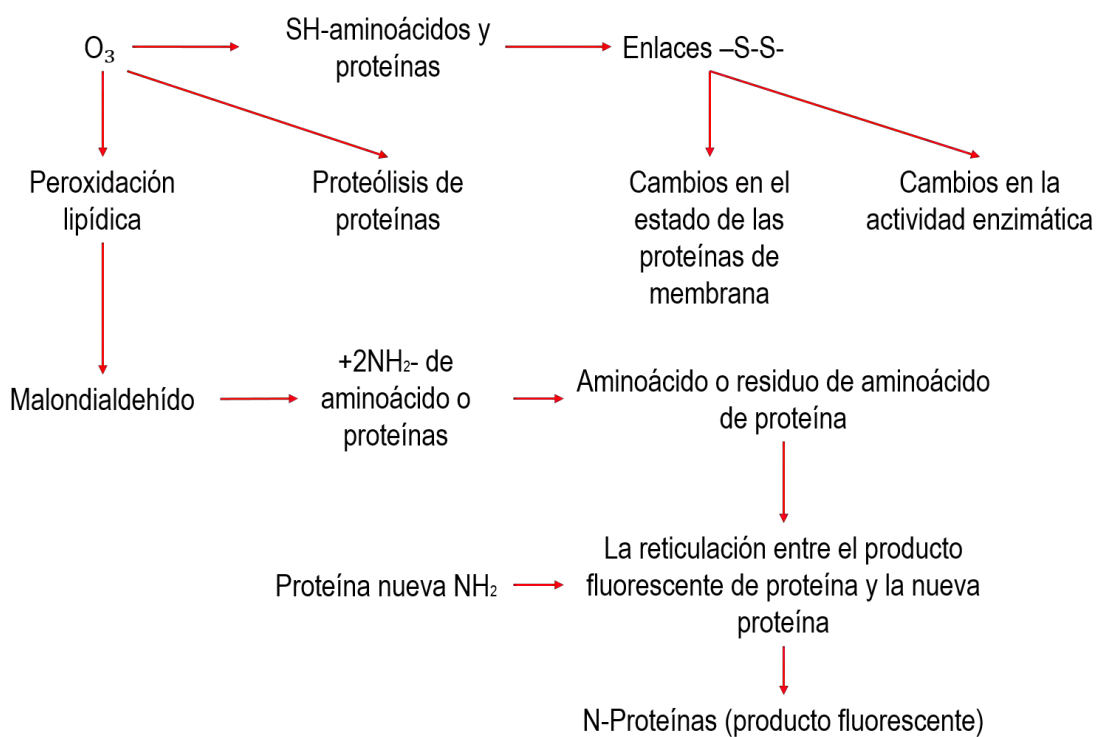


Figura 7 Esquema de interacción del ozono con proteínas.

El ozono reacciona con los grupos tiol (-SH) presentes en los aminoácidos, los cuales son oxidados formando compuestos de azufre que contienen SO_2 , el cual puede unirse a dos radicales orgánicos. De igual forma la reacción de ozono con el grupo tiol puede llevar a la formación de puentes disulfuro (-S-S-) entre las cadenas proteínicas. A nivel de organismos el ozono reacciona con los grupos tiol presentes en las proteínas de la membrana modificando así la permeabilidad membranosa, favoreciendo así la proteólisis. A su vez, el ozono puede reaccionar con componentes proteínicos del plasmalema, permitiendo así su penetración en la célula hasta llegar a organelos celulares (Roshchina & Roshchina, 2003).

Por su parte, la actividad enzimática de los organismos se ve afectada por efecto del ozono. Ya que disminuye la actividad de los marcadores enzimáticos de la parte interna de la membrana citoplasmática como son: la fosfatasa ácida y el fosfato deshidrogenasa de gliceraldehído. Un producto de la peroxidación lipídica como el malondialdehído presenta efectos sobre las proteínas y los aminoácidos. Los grupos aldehídos (-CHO) formados reaccionan con los grupos amino (- NH_2) presentes en las proteínas y aminoácidos, teniendo como resultado compuestos fluorescentes (Roshchina & Roshchina, 2003).

Por otra parte, estudios realizados con proteínas y ozono reportan que la reacción entre estos, produce la oxidación de la cadena principal del polipéptido de la proteína, la escisión del enlace péptido, entrecruzamiento proteína-proteína y la modificación de los aminoácidos de la cadena lateral (Cataldo, 2003). Además, el ozono produce cambios en las propiedades de la espuma formada por las proteínas, en el cual se ve favorecido el aumento en el volumen y la estabilidad de la burbuja formada por la proteína (Uzun et al., 2012).

4.3.7 Proteínas como tensoactivos naturales

Uno de los fundamentos principales de este trabajo es la actividad superficial de las proteínas. Es sabido que, los líquidos puros no son capaces de formar espumas, es por ello que se estableció que era necesaria la formación de una capa de moléculas adsorbidas a la superficie para la producción y estabilización de espumas (Wierenga & Gruppen, 2010).

La formación de espumas es consecuencia de agentes activos de superficie (tensoactivos), los cuales son moléculas con propiedades anfílicas que reducen la energía libre del sistema (tensión superficial), dichas moléculas se localizan en la interface aire-líquido, formando capas de separación entre estas. Las moléculas anfílicas se localizan en la interface debido a su estructura está compuesta por las regiones hidrófilas e hidrófobas. Los tensoactivos son utilizados como adhesivos, floculantes, humectantes, agentes espumantes y emulsionantes (Mulligan, 2005).

La eficiencia de un tensoactivo se determina por su capacidad para reducir la tensión superficial, que es una medida de la energía libre de superficie por unidad de área requerida para llevar una molécula del seno de la solución a la superficie. La tensión superficial se correlaciona con la concentración del agente tensoactivo hasta que se alcanza la concentración micelar crítica (CMC), los tensoactivos eficientes tiene una concentración micelar baja, es decir, menor cantidad de agente tensoactivo es necesaria para lograr el mayor abatimiento de

la tensión superficial. La CMC se define como la concentración mínima necesaria para iniciar la formación de micelas (Mulligan, 2005).

El término tensoactivo se puede referir a pequeñas moléculas simples formadas por una cabeza polar unida a una cola alifática o macromoléculas biológicas complejas, como por ejemplo las proteínas (Germain & Aguilera, 2014; Mulligan, 2005).

Por otra parte, las proteínas son polímeros lineales contruidos por aminoácidos, estos se clasifican de acuerdo a las propiedades químicas de su cadena lateral, esta se clasifica según su polaridad, estructura, reactividad, los elementos químicos presentes y su habilidad para formar enlaces de hidrogeno. La diferencia en la naturaleza química de los aminoácidos concede a las proteínas su estructura anfifílica y su actividad superficial, sin embargo, no todas las proteínas muestran actividad superficial. Es por ello que para actuar como agentes tensoactivos las proteínas deben de ser capaces de (1) difundirse por el seno de la solución, (2) adsorberse en la interface, (3) desplegarse y (4) formar redes viscoelásticas, Figura 8.

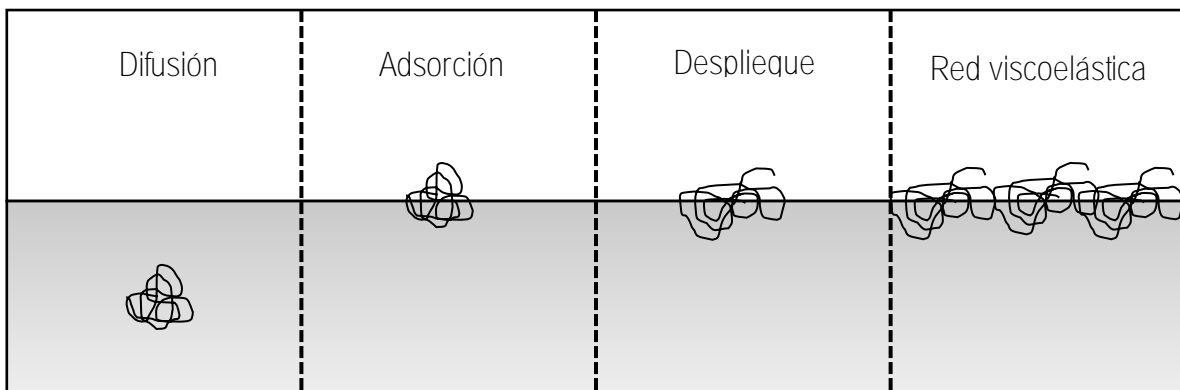


Figura 8 Mecanismo de acción de las proteínas como tensoactivos.

El mecanismo de acción de las proteínas como tensoactivos: (1) las proteínas se difunden desde la fase continua hasta la interfaz, este fenómeno es controlado por el tamaño de la proteína y la viscosidad de la solución, (2) una vez cerca de la interface la proteína pasa a un estado adsorbido, la adsorción neta de las proteínas es controlada por barreras de energía cinética que determina la relación entre la adherencia y la desorción. Las proteínas adsorbidas sufren un cambio de configuración exponiendo sus grupos hidrofóbicos a la fase gas y los hidrófilos al medio acuoso. (3) La cinética de desplegamiento es controlada por la energía de activación requerida para romper las interacciones intermoleculares de las proteínas. (4) Finalmente la capa interfacial formada es una red viscoelástica de proteínas, la formación de la red depende de la reactividad química y la actividad fisicoquímica de las cadenas laterales de las proteínas (Germain & Aguilera, 2014; Wierenga & Gruppen, 2010).

La relación entre la formación y estabilidad de la espuma producida por un tensoactivo proteínico y sus propiedades interfaciales son: (1) la velocidad de adsorción, (2) la estructura adoptada de la proteína en la superficie, (3) disminución de la tensión superficial y (4) la formación de una red viscoelástica en la superficie (Wierenga & Gruppen, 2010; Wilde, 2000).

4.4 Balance de energía para la producción de biodiesel a partir de microalgas

Una gran variedad de investigadores ha contribuido a la evaluación del análisis de ciclo de vida para el proceso de producción de biocombustibles a partir de microalgas, sin embargo, las inconsistencias en las definiciones de los límites del sistema y el modelado del proceso han dado como resultado una amplia gama de resultados (Quinn, et al., 2013).

La evaluación del análisis de ciclo de vida (LCA, por sus siglas en inglés) se ha convertido en la herramienta fundamental para evaluar la sostenibilidad de los biocombustibles de cualquier generación. La literatura LCA hace uso de métricas como es la relación de energía neta (NER, por sus siglas en inglés) y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) por unidad de energía producida. En este trabajo de investigación se realizará un ejercicio de balance energético.

El balance energético para los biocombustibles se refiere al análisis de la relación de energía neta (NER) de un sistema y se define como la relación de la energía total producida (contenido de energía del aceite y de la biomasa residual) sobre el contenido de energía necesaria para la producción del biocombustible, Ec. (1); (Jorquera, et al., 2010). Dentro de este trabajo de investigación las etapas que se consideraron dentro del proceso de producción de biodiesel son: cultivo, cosecha, secado de la biomasa, acondicionamiento de la biomasa, extracción (lípidos) y transesterificación (biodiesel).

$$NER = \frac{\sum \text{Energía producida por el biocombustible y la biomasa residual}}{\sum \text{Energía requerida para la producción del biocombustible}} \quad \text{Ec. (1)}$$

Mediante la elaboración del balance de energía se obtiene si el biocombustible a producir proporcionara mayor cantidad de energía durante su combustión de la que es requerida para su producción.

Los tipos de energía a considerar para el análisis de balance de energía para biocombustibles son (Duarte Murillo, 2010):

Energía de la materia prima o indirecta: Es la energía contenida en la materia prima que termina en el producto final; por ejemplo: energía del metanol, catalizadores, solventes, etc.

Energía de proceso o directa: Es la energía que no contribuye al contenido energético del producto, pero es necesaria para la conversión del producto: gas, electricidad, diesel, etc.

Energía fósil: Es la energía fósil o derivados de combustibles fósiles utilizados para la fabricación.

Energía final de combustible: Es la energía contenida en el producto que puede ser convertida en trabajo, es decir, el contenido energético de los biocombustibles.

De igual forma dentro del análisis balance de energía son requeridos otros parámetros o indicadores (Nava Bravo, 2015):

1. Energía total de entrada: Es la suma de todas las energías de los subprocesos involucrados en la producción del biocombustible
2. Crédito energético: Es la energía proporcionada por los subproductos
3. Productividad energética: Es la relación de la cantidad producida del biocombustible, en unidades de masa o volumen, con respecto a la energía invertida en su obtención
4. Rendimiento unitario: Es la cantidad de biocombustibles obtenido (volumen, peso o energía) por unidad de superficie utilizada (Ha).

Es importante resaltar que los resultados de LCA y del balance energético son muy sensibles a las definiciones de los límites del sistema, los inventarios del ciclo de vida, eficiencia de los procesos y unidades funcionales.

La escasez de datos energéticos de producción de biodiesel de microalgas a gran escala conduce a los autores a realizar diversas suposiciones para lograr un acercamiento real al consumo energético del sistema. Los datos en que se basan los LCA deben extrapolarse de los sistemas a nivel laboratorio. A pesar de las limitaciones existentes el LCA funciona como una herramienta para ayudar en el diseño de cualquier sistema de estudio (Slade & Bauen, 2013).

4.4.1 Procesos involucrados en el balance energético para la producción de biodiesel y bioetanol de microalgas.

Para llevar a cabo el balance de energía de producción de biocombustibles a partir de microalgas es necesario conocer las etapas del proceso dentro del tren de producción. A continuación se describen las más importantes y los insumos energéticos involucrados.

Cultivo de microalgas.

El uso de biorreactores tubulares horizontales (PBR, sistema cerrado) no son energéticamente factibles ($NER < 1$) comparados con los reactores de placa plana y estanques de rodadura ($NER > 1$) que son sistemas abiertos (Jorquera, et al., 2010). Se han reportado valores de consumo de energía de 55 W/m^3 para placas

planas y hasta de 2.000-3.000 W/m³ para reactores tubulares horizontales. Los "Raceway" o estanques de rodadura son fabricados con materiales de bajo costo, requieren una menor inversión, y de menos energía para el mezclado, el cual es del orden de 4 W/m³ (Collet, et al., 2013; Jorquera, et al., 2010).

Estudios de balance de energía donde se tiene una base de cálculo de 100,000 kg/año de biomasa microalgal para tres sistemas de cultivo (Raceway, Placa plana y Biorreactores), indican que los reactores tipo Raceway son más eficientes energéticamente, aunque presentan la menor concentración de biomasa producida (Tabla 5).

Tabla 5 Consumo energético por la etapa de cultivo según Jorquera (2010).

	Raceway	Placa plana	Biorreactores
Consumo energético (W/m ³)	3.72	53	2500
Biomasa producida (g/L)	0.35	2.7	1.02
NER de producción de aceite	3.05	1.65	0.07
NER de producción de biomasa	8.34	4.51	0.20

Cuando se utiliza un reactor tipo Raceway para el cultivo de microalgas, se debe tomar en cuenta el consumo de energía necesario para mantener homogenizado el sistema, cuyas velocidades de mezclado están en un intervalo de 20-25 m/s, con un valor de energía específica de 0.1 W/m. De igual manera se debe considerar el consumo energético para bombear el cultivo a procesos posteriores y el cual se estima es del orden de 32.6 kJ/m³ (Zhang, et al., 2013).

Cosechado de microalgas.

Dentro de la Tabla 2 de este trabajo de investigación se pueden observar los diferentes procesos de cosechado de microalgas y el consumo energético de cada uno de ellos. Para el caso del proceso de ozonoflotación existe información muy limitada, Nava (2014) reporta un consumo de energía para esta etapa de 97 MJ/kg de Biodiesel producido. Aunado al sistema de cosechado se encuentra el sistema de secado de la biomasa para lo cual existen diversos mecanismos para llevarlo a cabo por ejemplo el uso de la energía solar, dicha técnica dentro del balance energético tendría un consumo energético igual a cero, sin embargo, al ser un proceso lento no se ha considerado a nivel comercial. Por otra parte, se tiene el secado con vapor cuyo consumo energético es de 134 kW/Ton de biomasa (Zhang, et al., 2013).

La ozono flotación produce la lisis en la microalga por lo tanto está actuando como un pre-tratamiento (Valeriano, 2013), por lo tanto la energía requerida para llevar a cabo esta etapa (típicamente triturado) se estaría ahorrando, se considera que un sistema triturado de biomasa consume aproximadamente de 16 kWh/Ton de biomasa triturada.

Extracción y transesterificación de lípidos de microalgas para producción de biodiesel

La extracción de ácidos grasos se efectúa de diferentes formas a nivel laboratorio, entre éstos destacan los métodos de extracción con solventes orgánicos, la extracción mediante ultrasonido, extracción mediante fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas, shock osmótico, la extracción enzimática y la destrucción mecánica (Lee et al., 2010).

El proceso de extracción de ácidos grasos debe ser selectiva a estos compuestos, debido a que se busca reducir la extracción de otras moléculas presentes en las microalgas (por ejemplo: proteínas y carbohidratos), de no ser el caso se recurre a una etapa posterior de purificación.

Actualmente existe muy poca información energética para el proceso de transesterificación de ácidos grasos de microalgas, sin embargo, se ha reportado que la utilización de un homogenizador para llevar a cabo la reacción de transesterificación produciría un gasto energético de 47.18 MJ/ha (Kumar Naraharisetti, et al., 2017). Aunado a esto se requiere la evaporación del metanol para lo cual se considera una energía de 625kWh de caudal de metanol a una eficiencia de recuperación de 96%.

La transesterificación es el proceso en el cual los lípidos son convertidos en biodiesel, durante la reacción los triglicéridos (compuestos lipídicos) se hacen reaccionar con un alcohol (metanol, etanol, isopropanol y butanol) obteniéndose secuencialmente como producto diglicéridos, monoglicéridos y finalmente glicerol (subproducto), el éster de alquilo (biodiesel) que se produce durante cada secuencia (Velasquez-Orta, et al., 2012). El proceso de transesterificación es afectado por diversos factores como son: la relación molar glicéridos y alcohol, la temperatura de reacción tiempo, catalizadores, el contenido de ácidos grasos libres y el contenido de agua en la biomasa (Yaakob, et al., 2014).

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para lograr satisfacer los objetivos planteados en este trabajo de investigación, se estableció una metodología experimental dividida en tres fases experimentales, como se puede observar en la Figura 9. De manera general, la primera fase tuvo como objetivo evaluar el efecto tensoactivo de las proteínas liberadas durante el proceso de ozono flotación y su identificación. Para lograrlo se utilizó un consorcio microalgas proveniente del lago Nabor Carrillo, ubicado en la zona Federal del ex lago de Texcoco, México. Las cuales fueron cosechadas por ozono flotación, las pruebas se realizaron en una columna de flotación, en la cual el ozono fue inyectado a través de un difusor de vidrio poroso, obteniendo así un proceso de flotación dispersa. Durante esta fase experimental solo se llevaron a cabo pruebas de cosechado de microalgas por ozono flotación, las cuales permitieron observar el abatimiento de la tensión superficial de las muestras por efecto del tensoactivo liberado (proteína), de igual forma se logró la identificación de los tensoactivos proteínicos liberados por el ozono. Asimismo, se llevó a cabo la evaluación del rendimiento de biomasa y lípidos recuperados durante el cosechado.

La segunda fase se planteó sobre la base experimental y los resultados obtenidos en la FASE 1. A partir de esta fase se decidió utilizar un consorcio microalgal conteniendo *Scenedesmus obliquus* como especie dominante, previamente adaptada y cultivada en agua residual de la planta de tratamiento Cerro del Agua, de Ciudad Universitaria. Lo anterior con la finalidad de tener un mayor control en los ensayos de ozoflotación y experimentar con cultivos de mayores concentraciones de microalgas. En esta fase experimental se realizaron pruebas preliminares para el cosechado de la biomasa por flotación ozono-aire, las cuales tuvieron como objetivo evaluar el efecto del ozono como un pretratamiento para la desestabilización de la muestra a través de la medición del potencial zeta y la liberación de tensoactivo proteínico. Para ello se inyectó primero el ozono gas al reactor de flotación seguido de aire. De igual forma se llevó a cabo la evaluación del rendimiento de biomasa cosechada utilizando solo ozono y la combinación de ozono-aire.

Finalmente, la tercera fase de experimentación tuvo como objetivo llevar a cabo la evaluación del proceso de cosechado por flotación ozono-aire a través de la evaluación del rendimiento de la biomasa recuperada y el contenido de lípidos, carbohidratos, proteínas y el perfil de FAME. De igual forma, dentro de esta fase de experimentación se evaluó el método de cosecha con el uso de otra microalga, en este caso se utilizó *Desmodesmus sp.* Es preciso mencionar que la realización del balance de energía se llevó a cabo con los resultados obtenidos durante esta fase.

A continuación, se describen cada una de las fases de experimentación.

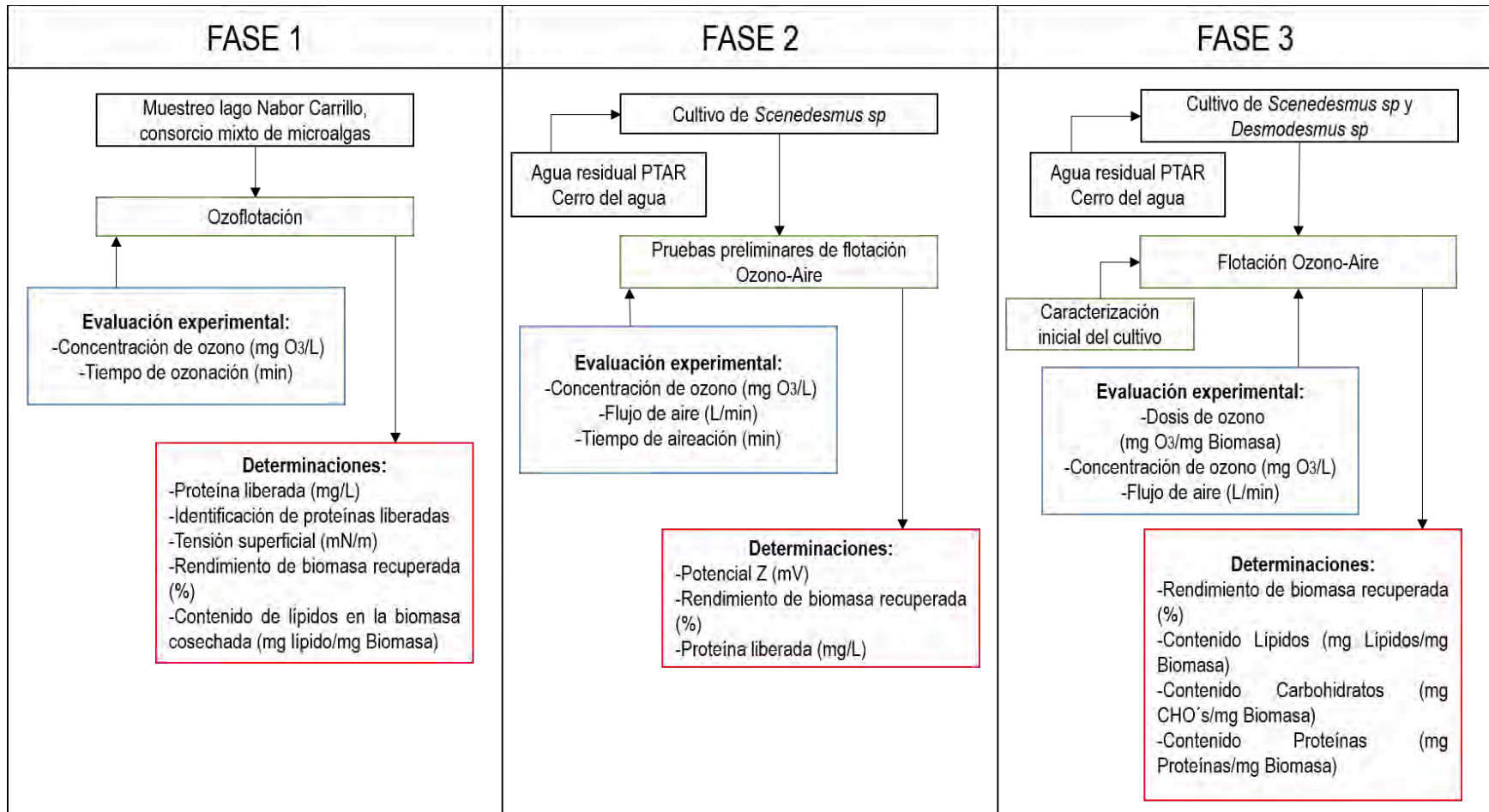


Figura 9 Experimentación realizada durante este trabajo de investigación.

5.1 Fase 1 de experimentación

5.1.1 Muestra de microalgas

Un consorcio nativo de microalgas del Lago Nabor Carrillo (Texcoco, México) se utilizó en esta fase experimental. El muestreo se realizó durante el mes de abril de 2014, y las muestras fueron obtenidas cada semana, las cuales se almacenaron inmediatamente a 4 °C y fueron procesadas al día siguiente. La concentración de microalgas como sólidos suspendidos totales (SST), fue determinada graviméricamente (APHA-AWWA-WPCF, 1992), observando una concentración media de SST de 400 ± 20 mg/L. Los géneros de microalgas presentes en la muestra fueron identificados a través de observaciones al microscopio (Leitzlaborlux S, Alemania). Se encontró que las cianobacterias (*Arthrospira sp.*, *Spirulina sp.*, *Oscillatoria sp.*) y las algas verdes (*Desmodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.*) fueron los géneros más abundantes.

5.1.2 Cosechado por ozono flotación

Los experimentos se realizaron utilizando muestras de 950 ml de una suspensión homogeneizadas de microalgas. Las pruebas se llevaron a cabo por lotes en un reactor tubular, conformado por una columna de vidrio de 1.3 L de volumen (altura: 66 cm; diámetro interior: 4,9 cm). Para llevar a cabo los experimentos se utilizó un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, EE.UU.) con una capacidad de producción de 19 g O₃/h. El ozono gas fue inyectado con un flujo de 0.2 L/min utilizando un difusor de vidrio (tamaño de poro de 10-15 µm) ubicado en el fondo de la columna, Figura 10. La concentración de ozono en fase gas se determinó mediante el método yodométrico (Birdsall, et al., 1952). En el proceso de ozono flotación se tomaron dos tipos de muestras: 1) "proteína concentrada", la cual contenía la biomasa celular y proteínas disueltas en el líquido recuperado en el colector del reactor; 2) "proteína en el reactor", la cual contenía las proteínas que permanecieron en el líquido del reactor de ozono flotación. Al final de cada experimento, la concentración total de proteínas y la tensión superficial se midieron en ambas muestras. Se calculó el porcentaje de biomasa de microalgas cosechada restando el contenido de SST que permanecieron en reactor a los SST iniciales de la muestra.

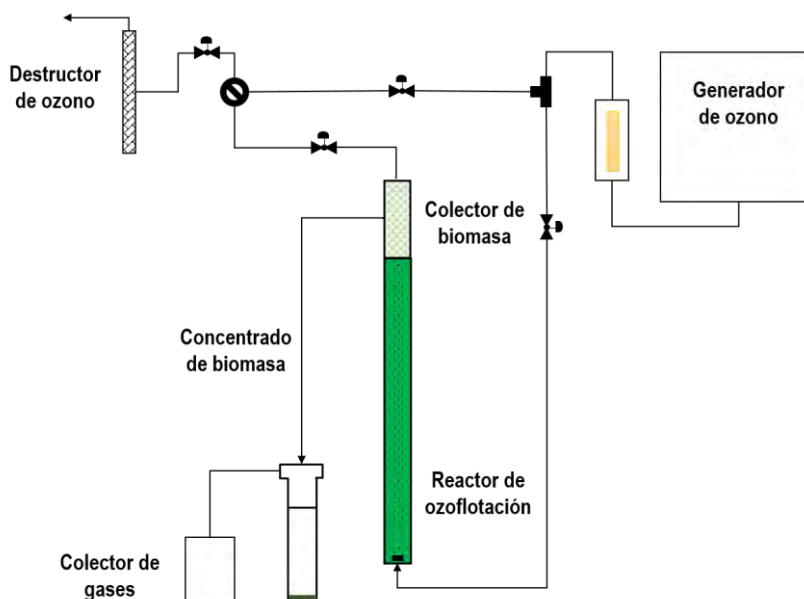


Figura 10 Diagrama experimental para las pruebas de ozono flotación.

5.1.3 Diseño de experimentos

La valoración de la proteína liberada (mg/L), la recuperación de biomasa (%) y el rendimiento de lípidos (mg lípidos/mg Biomasa) se evaluaron utilizando un diseño de experimentos de superficie de respuesta (diseño rotacional central compuesto de segundo orden). El diseño implicó la realización de 13 experimentos, cada uno con tres repeticiones. Estos incluyeron cinco puntos centrales y un punto axial, con un α de 1.68. Los factores variables fueron: concentración de ozono en la fase gaseosa (3-7 mg O_3 /L) y el tiempo de oxidación (15-35 min).

5.1.4 Pruebas de tensión superficial

La tensión superficial se midió en muestras obtenidas durante el cosechado de la biomasa, a partir de muestras de microalgas en agua residual y en muestras donde se utilizó biomasa pre-lavada para eliminar posibles interferencias de los componentes presentes en las aguas residuales (Por ejemplo, detergentes). El lavado de la biomasa consistió en eliminar agua residual por centrifugación, posteriormente el pellet formado se suspendió en agua destilada; el procedimiento se repitió tres veces. Finalmente, se obtuvieron 40 L de una suspensión de microalgas con una concentración de 400 mg SST/L para las pruebas.

Las muestras de proteína en el reactor y la proteína concentrada fueron filtradas utilizando una membrana Millipore de 0.22 mm (GWPO2500). La proteína se cuantificó utilizando el método Biuret (Merck 1103070500) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La experimentación para la evaluación de la tensión superficial se determinó según Pardo-Cervantes (2011). Las pruebas de tensión superficial se realizaron al equilibrio, para ello las muestras se dejaron reposar al menos 2 h a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en una caja Petri. El método anillo fue elegido para evaluar la superficie tensión. El equipo fue ensamblado utilizando una balanza digital (Aventurero, Ohaus, Pine Brook, NJ) con un gancho debajo para colgar el anillo de DuNouy de platino (CSC Scientific Co. Inc., USA), el cual tiene una circunferencia de 5,992 cm y un $R/r=53.6$. Las muestras se colocaron sobre un ascensor de velocidad controlada (Orbisphere Labs., Neuchatel/Ginebra, Suiza), el cual coloco las muestras a una distancia entre la superficie de la muestra y el anillo. El ascensor descendió y el peso máximo tirado por el anillo fue registrado. La tensión superficial se determinó usando la ecuación (2). Las mediciones se realizaron por triplicado.

$$\sigma = \frac{Mg}{4\pi R} * F \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde M es el peso máximo soportado por el anillo, g es la gravedad local (977.94 cm/s^2 , CU-UNAM), R es el radio del anillo y F es un factor de corrección por ajuste del tamaño del anillo (R^3/V , V es el volumen máximo soportado por el anillo), obtenido de las tablas (Harkins & Jordan, 1930).

Con el fin de determinar la concentración de proteína necesaria para reducir la tensión superficial, así como la dosis de ozono necesaria para el cosechado de las microalgas, se determinó la CMC, la cual, es la concentración mínima que desencadena la formación de micelas (Mulligan, 2005) y se calculó utilizando la ecuación desarrollada por Viades-Trejo y Gracia-Fadrique (2008).

5.1.5 Identificación de las proteínas liberadas durante el proceso de ozono flotación

La proteína total liberada al medio acuoso fue identificada después del proceso de ozono flotación, usando tres dosis diferentes de ozono ($27.8 \text{ mg O}_3/\text{L}$, $43.3 \text{ mg O}_3/\text{L}$ y $54.4 \text{ mg O}_3/\text{L}$). Para validar que las proteínas identificadas fueron liberadas de las células debido al efecto del ozono, se compararon con proteínas de microalgas extraídas por el método alcalino (Safi, et al., 2014). Para este último caso, se añadieron 50 ml de una solución de NaOH a pH 12 a 1 g de biomasa de microalgas seca y la muestra se calentó a 40°C con agitación durante una hora. Las proteínas extraídas se recuperaron de la fase acuosa mediante centrifugación a $5,000 \text{ g}$ durante 10 min.

Las proteínas se aislaron usando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12%. Se inyectaron $25 \mu\text{L}$ de proteínas totales obtenidas de las muestras a un gel de electroforesis, junto con un marcador de peso molecular que oscilaba entre 15 y 250 KDa (Dual-color, BioRad).

La electroforesis se realizó a 45 V durante 24 h a temperatura ambiente en un tampón de corriente SDS-PAGE, en una Unidad Vertical 600 SE (GE-Healthcare). El SDS-PAGE se tiñó con azul de Coomassie.

A continuación, las bandas de SDS-PAGE de interés se escindieron con un bisturí estéril y se trataron con digestión de tripsina en gel. La digestión en gel se realizó con tripsina porcina modificada **30 µL** en una solución que contenía 20 ng/µL. **Las muestras** fueron encubadas a 37 °C durante 18 h.

La identificación de las proteínas se realizó mediante espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS); en un sistema integrado nano-LC-ESI-MS/MS (Espectrómetro de masas/tiempo de vuelo, SYNAPT G2 HD, Waters Corporation) equipado con una fuente de iones NanoLockSpray; y un nanoACQUITY-UPLC (Waters Corporation).

Los resultados fueron procesados a través de ProteinLynx Global Software (PLGS) (Waters Corporation) y comparados con la base de datos UNIPROT. Se consideró que los péptidos correspondían a las puntuaciones de PLGS a un nivel de confianza del 96% o superior.

5.1.6 Extracción de lípidos de la biomasa microalgal

Las microalgas separadas por ozono flotación fueron centrifugadas a 15,000 g a 20 °C durante 10 min utilizando una centrífuga Beckman Coulter (AVANTI-J26S XPI). La biomasa se secó en horno a 40°C, durante 8 h. La extracción de lípidos se realizó utilizando cloroformo:metanol de 2:1 (v/v) (Komolafe, et al., 2014). A 1 g de biomasa de microalgas se añadieron 30 mL de cloroformo y 15 mL de metanol. La solución se dejó durante una noche a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron filtradas a vacío usando un papel de filtro de microfibras de vidrio Whatman (GF/A). El filtrado se colocó en embudos de separación, a continuación, se añadió una solución salina de cloruro de potasio (KCl, 0.88% en volumen) al 25% del volumen de partida. La mezcla se homogenizó y se esperó hasta que se formaran dos fases. La fase orgánica se colocó en matraces cónicos previamente pesados y se dejaron secar en campana de extracción hasta obtener peso constante. La masa de lípidos de microalgas se obtuvo finalmente restando el peso inicial del matrazal peso final del matrazal - lípidos.

5.2 Fase 2 de experimentación

5.2.1 Muestra de microalgas

Durante esta fase experimental se trabajó con un cultivo de microalgas, en el cual predominaba la especie *Scenedesmus obliquus*. Esta fue cultivada **en agua residual de la planta de tratamiento “Cerro del Agua”** ubicada en Ciudad Universitaria, UNAM. Dicha agua residual fue previamente caracterizada obteniendo los siguientes parámetros de calidad: pH de 8.3±0.5, ortofosfatos de 27.98±1.8 mg/L, nitrógeno amoniacal 102.06±3.2 mg/L y nitrógeno total 112.51±2.4 mg/L (Hernández García, 2017). El cultivo de microalgas se llevó a cabo en

biorreactores de tereftalato de polietileno (PET), con capacidad de 10L. El cultivo se realizó por lotes, con un fotoperiodo de luzoscuridad de 12:12, mediante la implementación de lámparas de LED. El periodo de cultivo fue de 10-15 días, tiempo en el que se alcanzó la concentración de biomasa deseada.

5.2.2 Cosechado por flotación ozono -aire

Las pruebas de cosechado por flotación ozono-aire se realizaron en un reactor tipo espumador previamente diseñado en el grupo de investigación (Rodríguez Muñoz, 2015). El cual está constituido por una columna de vidrio, un colector de espuma en la parte superior, un difusor de vidrio de plato poroso (10-15 μ m) y un punto de muestreo a mitad de la columna. Se utilizaron ozono y aire como gases acarreadores, los cuales fueron inyectados por la parte inferior de la columna a un flujo constante de 0.5 L/min. Los gases se inyectaron de manera alterna, es decir, primero ozono y posteriormente el aire. Para llevar a cabo los experimentos fue necesario adaptar una línea de aire a la unidad de oxidación (descrito en la sección 5.1.2), Figura 11. El flujo de aire se determinó a través de un rotámetro, conectado a la línea de aire. Por otra parte, se utilizó un litro de cultivo de microalga para llevar a cabo cada uno de los experimentos.

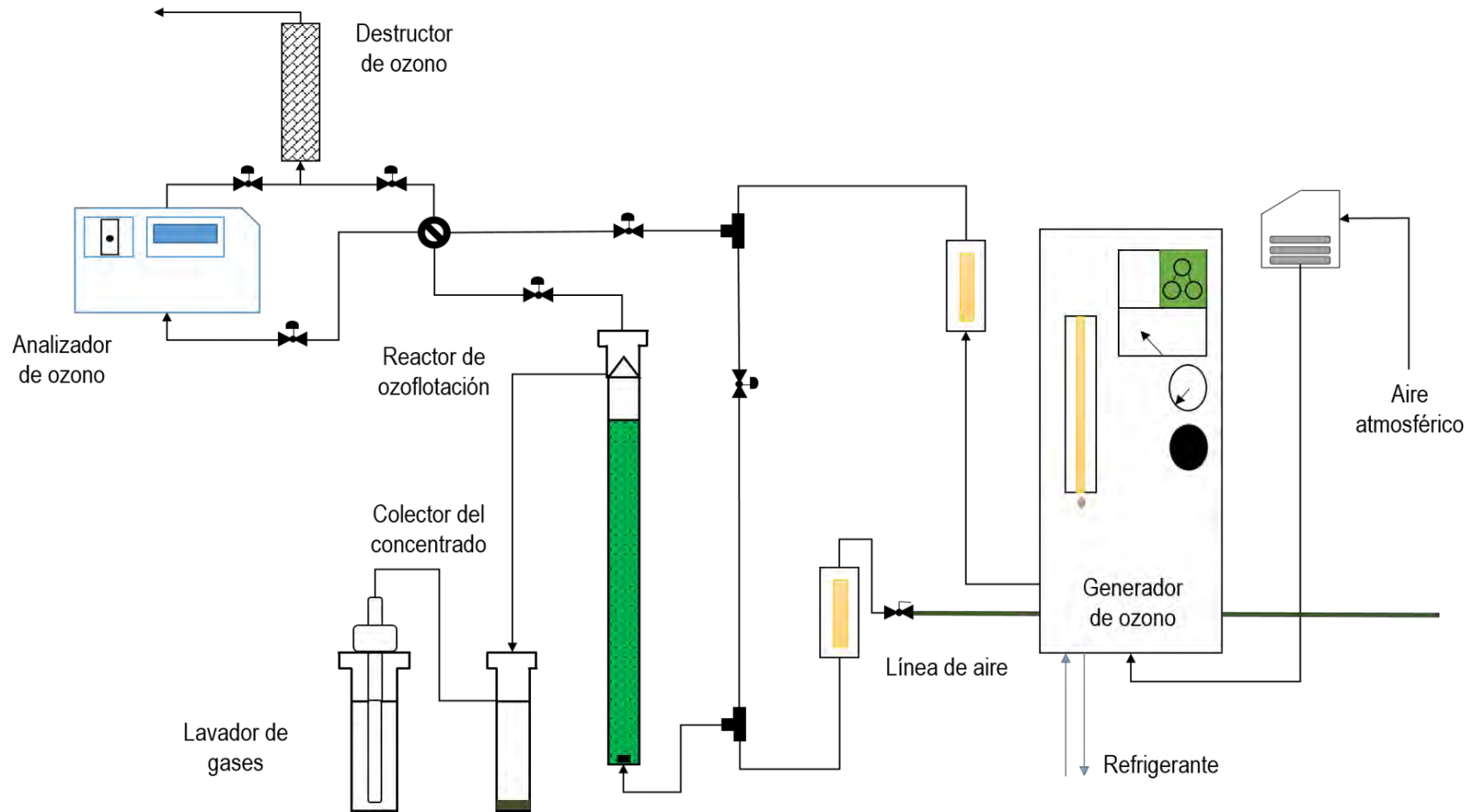


Figura 11 Diagrama experimental para las pruebas de flotación de ozono-aire.

5.2.3 Diseño de experimentos, Fase 2 de experimentación

La estimación de la desestabilización de las partículas, la liberación de tensoactivo, la recuperación de biomasa por efecto de la flotación con ozono y la recuperación de la biomasa por la flotación ozono-aire se evaluó a través de un diseño de experimentos factorial 2x2x4, los factores y niveles evaluados fueron: concentración de biomasa (300 y 500 mg SST/L), concentración de ozono en fase gas (5 y 10 mg/L) y tiempo de aplicación de ozono (1, 2, 3 y 6 min). El diseño arroja un total de 16 experimentos, cada uno con tres repeticiones. Las influencias de estos factores de operación se determinaron para los factores de respuesta: 1) desestabilización de partículas (ζ , mV), 2) liberación de proteína total (mg PT/L) y 3) biomasa recuperada (%).

5.2.4 Estabilidad de las partículas en la muestra

La evaluación del potencial zeta se realizó en muestras que fueron sometidas al efecto del ozono, debido a que se deseaba observar el efecto del ozono como desestabilizante de las microalgas. Dichas muestras fueron obtenidas al cumplirse el tiempo de ozono flotación, es decir, al concluir el periodo de pretratamiento con ozono como gas disperso, las muestras fueron tomadas del punto de muestreo de la columna. Muestras de cultivo que no estuvieron en contacto con ozono fueron tomadas como valor inicial.

Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Superficies de la Facultad de Química de la UNAM. La medición se llevó a cabo mediante un Particle Sizing Systems, NICOMP (modelo NICOMP 380 ZLS).

5.2.5 Determinación de la proteína liberada y el rendimiento de recuperación de la biomasa

La estimación de la proteína liberada se determinó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. Por su parte el rendimiento de la biomasa se llevó a cabo a través de la estimación de los sólidos suspendidos totales (SST), los cuales se determinaron de acuerdo al método estándar, utilizando papel filtro GF/A (Whatman) (APHA-AWWA-WPCF, 1992).

5.2.6 Balance de masa para el proceso de cosechado

Para evaluar la recuperación de la biomasa en función al método de cosechado se planteó un balance de masa, para ello se evaluó el contenido de biomasa al inicio del proceso (cultivo), durante el cosechado (en el reactor, posterior al uso de O₃) y al final del cosechado (colector del concentrado y en la columna posterior al uso del ozono-aire).

5.3 Fase 3 de experimentación

5.3.1 Muestra de microalgas

Durante esta fase experimental se trabajó con dos cultivos independientes de microalgas. El primero fue un cultivo con predominancia de *Scenedesmus obliquus* y el segundo fue un cultivo mixto de *Desmodesmus sp.* El cultivo mixto de *Desmodesmus sp.* estaba conformado por las siguientes especies: *Desmodesmus intermedius*, *Desmodesmus opoliensis*, *Desmodesmus magnus* y *Desmodesmus communis* (Hernández García, 2017). Las microalgas fueron cultivadas **en agua residual proveniente de la planta de tratamiento “Cerro del Agua”, CU.** El cultivo de microalgas se llevó a cabo en biorreactores de tereftalato de polietileno (PET), con capacidad de 10 L. El cultivo se realizó por lotes, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12, mediante la implementación de lámparas de LED. El periodo de cultivo fue de 10-15 días, tiempo en el que se alcanzó la concentración de biomasa deseada.

5.3.2 Cosechado por flotación ozono-aire

Las pruebas de cosechado por flotación ozono-aire se realizaron de acuerdo a lo descrito en las secciones 5.1.2 y 5.2.2.

5.3.2 Diseño de experimentos Fase 3

La optimización del proceso se realizó en tres etapas, con las cuales se buscó obtener el mayor rendimiento de biomasa cosechada.

5.3.2.1 Evaluación del efecto de la dosis de ozono y el flujo de aire

En función a los resultados obtenidos previamente, se planteó un diseño de experimentos en el cual se observará el efecto de la dosis de ozono ($\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$) y el flujo de aire (L/min). Para ello se montó un diseño de experimentos factorial 2^3 , con dos factores en tres niveles: dosis de ozono (0.04, 0.05, 0.06 $\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$) y el flujo de aire (0.5, 1.0, 1.5 L/min). Dando un total de 8 corridas, las cuales se realizaron por triplicado. Durante este experimento se trabajó con el cultivo de *Scenedesmus sp.*, una concentración de biomasa $750 \pm 45 \text{ mg}/\text{L}$, la concentración de ozono en fase gas de $15 \text{ mg}/\text{L}$, volumen de la muestra de 1 L y flujo de ozono de $0.5 \text{ L}/\text{min}$. Como variables de respuesta se evaluaron: porcentaje de recuperación de biomasa.

5.3.2.2 Evaluación del efecto del flujo y tiempo de aireación

De acuerdo a los resultados estadísticos, se obtuvo la mejor condición de dosis de ozono para posteriormente probar una condición de flujo de aire (L/min): 0.5, 1.0 y 1.5; y tiempo de aireación (min): 2, 4 y 6. Con un diseño de experimentos factorial 2³. Conservando las variables fijas. De igual forma se obtuvieron como variables de respuesta la recuperación de la biomasa.

5.3.2.3 Evaluación de la dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire.

La evaluación del método de cosecha se realizó para un cultivo de microalgas con predominancia de *Scenedesmus obliquus* a través de la determinación del porcentaje de biomasa recuperada, el rendimiento lipídico (mg lípidos/mg biomasa), rendimiento de carbohidratos (mg CHO's/mg biomasa) y rendimiento de proteínas (mg proteínas/mg biomasa). Para lograr el objetivo se estableció un diseño factorial 3³, tomando como factores: la concentración de ozono (con tres niveles: 13, 18 y 25 mg O₃/L), la dosis de ozono aplicada (con tres niveles: 0.04, 0.09 y 0.16 mg O₃/mg Biomasa) y el flujo de aire (con tres niveles: 0.5, 1.0 y 1.5 L/min). Cada una de los experimentos se realizó por triplicado, dando un total de 81 pruebas realizadas. Posteriormente, la mejor condición obtenida para el proceso de cosechado se probó con el cultivo mixto de *Desmodesmus sp.*

La dosis de ozono (mg O₃/mg Biomasa) es la cantidad de ozono que fue aplicado durante el proceso de cosechado por unidad de biomasa, esta definida como la relación entre la concentración de ozono de gas de entrada (mg O₃/L) y la concentración de la biomasa microalgal al inicio del experimento (mg Biomasa/L). La dosis de ozono que se utilizó durante este trabajo de investigación surge a partir de la dosis de ozono aplicada (DOA), Ec. 2.

$$DOA = \frac{C_{O_3 \text{ Entrada}} * Q_{O_3} * T}{V_M} \quad Ec. 2$$

Dónde $C_{O_3 \text{ Entrada}}$ es la concentración de ozono a la entrada, Q_{O_3} es el flujo de gas de entrada, T es el tiempo y V_M es el volumen de la muestra. Dentro de la ecuación 2, destaca el factor T , ya que este parámetro define el tiempo durante el cual se debe aplicar el pretratamiento con ozono dentro del proceso de flotación ozono-aire, Ec. 3.

$$T = \frac{DOA * V_M}{C_{O_3} * Q_{O_3}} \quad Ec. 3$$

De igual forma, se evaluó la eficiencia de transferencia del ozono para el proceso de flotación ozono-aire para el recuperado de la biomasa, Ec. 4. Dónde $C_{O_3 \text{ Salida}}$ es la concentración de ozono a la salida.

$$ET = \frac{(C_{O3\text{Entrada}} - C_{O3\text{Salida}})}{C_{O3\text{Entrada}}} * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

5.3.4 Determinación del contenido de lípidos en la biomasa microalgal, por el método de la sulfo-fosfo-vainillina

La técnica se fundamenta en la reacción de los lípidos insaturados con ácido sulfúrico para formar iones carbonio. Por otra parte, la vainillina reacciona con el ácido fosfórico produciendo éster de fosfato aromático. Posteriormente al estar en contacto el ión carbonio reacciona con el grupo carbonilo de la fosfo vainillina, la reacción da como resultado un color rosado, el cual es medido a una longitud de onda de 530 nm. Sin embargo, los ácidos grasos saturados, triglicéridos y glicerol no reaccionan para formar ion carbonio. No obstante, lo anterior puede ser corregido dentro del método de cuantificación a través de la selección de un aceite adecuado para llevar a cabo la curva de calibración, la cual debe tener un contenido de ácidos grasos similar a lo que se desea analizar. En este caso se utilizó aceite de canola para la curva de calibración (Byreddy, et al., 2016; Mishra, et al., 2014; Knight, et al., 1972).

La técnica se lleva a cabo colocando una cantidad de biomasa conocida en un tubo de ensayo a la cual se agregan 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. El tubo se somete a baño de agua hirviendo ($100\text{ }^\circ\text{C}$), durante 15 min. Posteriormente se pasa a un baño de hielo por 5 min. A continuación, se adicionan 5 mL del reactivo de fosfo vainillina. La muestra se incuba por 15 min a $37\text{ }^\circ\text{C}$ a una agitación de 200 rpm. El color se deja estabilizar por un periodo de una hora.

Un litro de reactivo de fosfo vainillina se prepara a partir de 1.2 g de vainillina, al cual se le adicionan 10 mL de etanol y 90 mL de agua Milli-Q. Lo anterior se afora a 1 L con ácido fosfórico.

5.3.5 Determinación del contenido de carbohidratos (CHO's) en la biomasa microalgal, por el método de fenol-sulfúrico

La técnica detecta carbohidratos incluyendo mono, di, oligo y polisacáridos. La adición de H_2SO_4 produce la ruptura de estos transformándolos a monosacáridos. En el caso de presentarse una pentosa son deshidratadas a furfurales y para las hexosas son llevadas a hidroximetil furfural. Estos compuestos reaccionan con el fenol para producir una coloración dorada (Dubois, et al., 1956).

La técnica se lleva a cabo utilizando una solución de fenol al 5% (m/m) en agua destilada y H_2SO_4 concentrado (98%). El procedimiento es el siguiente: se colocó 1 mL de muestra con concentración conocida, a la cual se agregó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de H_2SO_4 (98%). La mezcla se homogeniza y se deja reposar durante 10 min. Posteriormente se coloca en un baño de agua a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 490 nm. La curva de calibración se construyó con glucosa.

5.3.6 Determinación del contenido de proteínas en la biomasa microalgal, por el método alcalino

En el método alcalino, consistió en la extracción de las proteínas presentes en la biomasa microalgal; se contó con muestras de biomasa de microalgas seca de 500 mg a la cual se añadieron 25 ml de una solución de NaOH a pH 12. La muestra se calentó a 40°C con agitación constante durante una hora. Las proteínas extraídas se recuperaron de la fase acuosa mediante centrifugación a 5,000 g durante 10 min. Finalmente, la concentración de la proteína se determinó mediante el método de Biuret (sección 5.1.4).

5.3.7 Determinación del perfil lipídico de las microalgas

Los lípidos presentes en las microalgas fueron extraídos a través de solventes orgánicos, cloroformo: metanol, a través del procedimiento descrito en la sección 5.1.6.

Posteriormente, se realizó la transesterificación de los lípidos extraídos para la obtención de los FAME. La reacción se llevó a cabo a partir de las muestras de lípidos extraídos a las cuales se agregaron 10 mL de metanol, la reacción fue catalizada con H₂SO₄ a una concentración de 0.04 N. La reacción se realizó a una temperatura de 60 °C, en agitación constante mediante un agitador orbital. Consecutivamente, el metanol se evaporó a presión reducida mediante una campana de extracción hasta obtener un volumen final de 2 mL, el cual se centrifugó durante 30 min a 5,000 rpm, eliminando así impurezas. Las muestras se conservaron a 4 °C, para su posterior análisis cualitativo mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).

Para la identificación de los FAME se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6809, acoplado a un espectrofotómetro de masas Agilent Technologies 5973. La detección de los FAME se hizo a través de una columna de separación DB-5ms de sílice fundido con una longitud de 30 m, un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de película de 0.25 µm. El gas acarreador para el análisis fue helio con 99.9995% de pureza.

Condiciones de operación del CG-EM: la temperatura del inyector fue de 250 °C, con una inyección tipo Split; el espectrofotómetro de masas se programó a una temperatura de 280 °C. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: temperatura inicial 85 °C (5 min) con una rampa de 7 °C/min, hasta llegar a 265 °C (10 min). Para la identificación de los FAME el espectrofotómetro operó en modo SCAN a 50-550m/z.

Los datos obtenidos se registraron y presentaron como un cromatograma a través de un software especializado (Hewlett Packard Chemstation versión B.02.05). De igual forma el software cuenta con programa de integración, detección de picos, corrección de líneas base y cálculos finales de abundancia (área bajo la curva).

Con la finalidad de corroborar las condiciones de operación y los resultados obtenidos, los FAME fueron identificados comparando el tiempo de retención con un estándar conocido de FAME Mix C8-C24 (Sigma Aldrich, 18918-1AMP, USA).

5.4 Balance de energía

Cabe resaltar que la metodología empleada para llevar a cabo el balance energético para la producción de biodiesel a partir de microalgas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nava (2015), sin embargo, fue necesario realizar adaptaciones a la técnica para satisfacer el objetivo de este trabajo de investigación.

De manera general la metodología empleada se describe a continuación en los siguientes pasos (Nava, 2015):

1. *Establecer el objetivo del estudio*
2. *Establecer los límites de proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas (definición de las etapas de proceso)*
3. *Definir las variables de proceso, como es la definición del volumen de producción, base de cálculo y suposiciones*
4. *Inventario de las energías específicas de cada etapa de proceso*
5. *Contabilizar las magnitudes energéticas obtenidas para el tren de producción de los biocombustibles*
6. *Cuantificar el aporte de los productos finales, obteniendo la energía aprovechable de los biocombustibles*
7. *Finalmente se obtuvo la relación entre la energía disponible de los productos con respecto a la energía consumida para su producción (NER)*

5.4.1 Definición del sistema de estudio.

El objetivo de este balance energético es evaluar la utilización del proceso de flotación ozono-aire como método de cosecha de microalgas dentro de tren de producción de biodiesel. Como tren de tratamiento se tomó en cuenta las siguientes etapas: 1) cultivo de microalgas, 2) cosechado, 3) secado de la biomasa, 4) acondicionamiento de la biomasa, 5) extracción y transesterificación y 5) purificación de biodiesel. Cabe resaltar que se utilizara la centrifugación como método de cosecha de referencia.

Para establecer los límites del sistema se recomienda crear escenarios hipotéticos que permitan obtener resultados los más cercanos a la realidad. El proceso de producción que se propone en este trabajo de investigación es el presentado en la Figura 12.

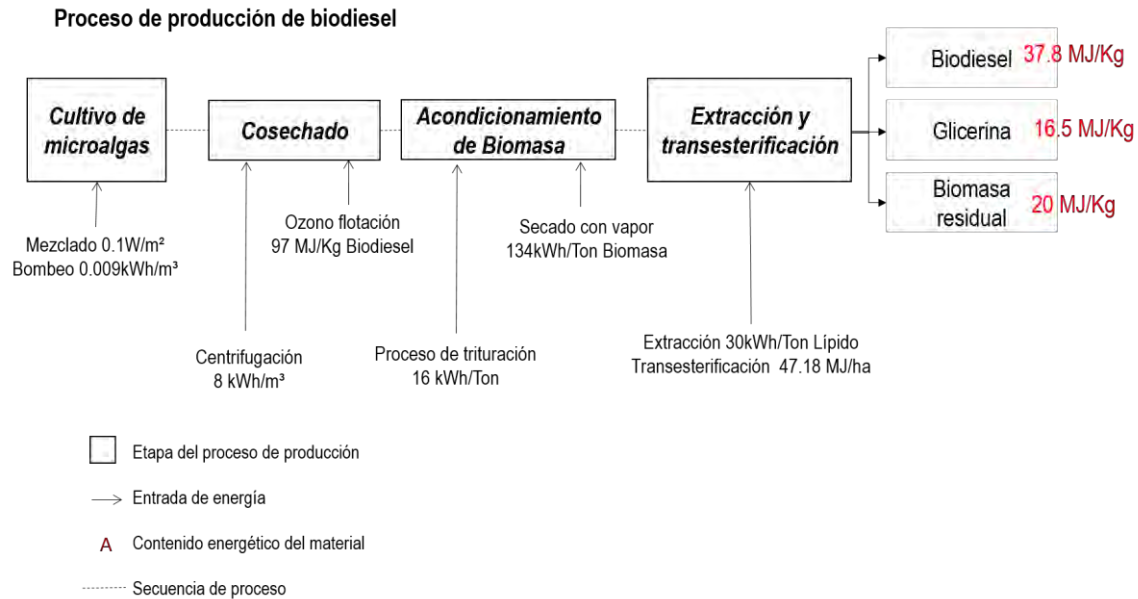


Figura 12 Procesos y energías consideradas dentro del ejercicio de balance energético para la producción de biodiesel a partir de microalgas.

De igual forma se puede apreciar dentro de la Figura 12 el consumo energético asociado a cada etapa del tren de producción de biocombustibles.

Para llevar a cabo el balance energético se tomó en cuenta:

- ✓ Una producción de 1000Ton de Biodiesel al año
- ✓ Productividad de biomasa para las tres microalgas de 500mg/L que es la concentración aproximada que se ha logrado a nivel laboratorio (cosechado quincenal)
- ✓ Productividad de microalgas en estanques abiertos para México de 26 g/m²d (Nava, 2014)
- ✓ Se utilizó como contenido energético del biodiesel de 37.8 MJ/Kg y para la biomasa residual de 20 MJ/Kg

5.4.2 Cultivo de microalgas

Para llevar a cabo la estimación de la biomasa requerida para la producción de 1000 Ton de Biodiesel, para ello se debe tomar en cuenta la eficiencia de la reacción de transesterificación (Ec. 5) y el contenido de lípidos de las microalgas (Ec. 6).

$$\text{Aceite} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right] = \frac{\text{Producción de Biodiesel} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right]}{\text{Eficiencia de reacción} [\%]} \quad \text{Ec. (5)}$$

$$\text{Biomasa seca} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right] = \frac{\text{Producción de Aceite} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right]}{\text{Contenido lipídico} [\%]} \quad \text{Ec. (6)}$$

Se obtuvo el área de cultivo (estanque abierto) para la producción de biomasa para cada de una de las microalgas, se utilizó la productividad de microalgas en México calculada por Nava (2014) de $26 \text{ g/m}^2\text{d}$ (Ec. 7).

$$\text{Área de cultivo} \left[\frac{\text{Ha}}{\text{año}} \right] = \frac{\text{Biomasa seca} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right]}{\text{Productividad biomasa México} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{m}^2\text{d}} \right]} \quad \text{Ec. (7)}$$

El consumo energético asociado al cultivo de microalgas, se calculó en función al mezclado necesario para los estanques (Ec. 8) y del bombeo para mover el cultivo a la etapa posterior (Ec. 9) (Nava 2014).

$$\text{Mezclado} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] = 0.1 \frac{\text{W}}{\text{m}^2} * 0.00876A \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde:

A: Área de cultivo de las microalgas

0.00876: Factor de conversión

$$\text{Bombeo} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] = \frac{23.6 \frac{\text{KJ}}{\text{m}^3}}{C_{\text{Final}} \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right] * \left(\frac{1 \text{ Ton}}{1000\text{Kg}} \right)} * \left(\frac{\left(\frac{\text{Ton microalgas}}{\text{año}} \right) * (\% \text{ recuperación})}{3.6 \left(\frac{\text{MJ}}{\text{kWh}} \right)} \right) \quad \text{Ec. (9)}$$

Por lo tanto, el consumo total de energía para dicha etapa (Cultivo) es la suma de todas las energías involucradas, Ec (10).

$$\text{Cultivo} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] = \text{Mezclado} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] + \text{Bombeo} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] \quad \text{Ec. (10)}$$

5.4.3 Cosechado

Estudios previos para la etapa de cosechado de microalgas mediante ozono flotación establecieron las condiciones óptimas para la separación, estableciendo una dosis de ozono aplicada de 54.5mg/L, tiempo de retención de 35min y una eficiencia de recuperación del 98%. Para lo cual se requiere un gasto energético de 15 W por 0.9L de cultivo de microalgas. Nava (2015) estableció la Ec. (11) que relaciona la energía consumida durante el proceso.

$$\text{Flotación con ozono} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] = \frac{P * t * 1000}{v * 60 * C_{\text{final}} * 1000} * \left(\text{Biomasa seca} \left[\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right] \right) \quad \text{Ec. (11)}$$

Donde:

t: Tiempo de ozono flotación o pretratamiento, min

P: Potencia que consume el proceso para recuperar las algas, watts

v: Volumen tratado de microalgas, L

C_{Final}: Concentración de microalgas recuperadas, Kg/m³

5.4.4 Extracción y Transesterificación de Lípidos

Para obtener el consumo energético asociado al proceso de extracción y transesterificación presentas las ecuaciones. El valor total de energía requerido es la suma de las energías involucradas, Ec (10, 11).

$$\text{Extracción} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] = 30 \left[\frac{\text{kWh}}{\text{Ton}_{\text{Lípido}}} \right] * \text{Aceite requerido} \left[\frac{\text{Ton}_{\text{Lípido}}}{\text{año}} \right] \quad \text{Ec. (10)}$$

$$\begin{aligned} \text{Transesterificación} \left[\frac{\text{kWh}}{\text{año}} \right] \\ = 30 \left[\frac{\text{kWh}}{\text{Ton}_{\text{Biodiesel}}} \right] * \text{Biodiesel requerido} \left[\frac{\text{Ton}_{\text{Biodiesel}}}{\text{año}} \right] \quad \text{Ec. (11)} \end{aligned}$$

6 RESULTADOS

6.1 Efecto del ozono en la liberación de tensoactivo y en la desestabilización de la microalgas durante el proceso de cosechado.

6.1.1 Efecto de la ozono flotación en la liberación de tensoactivos naturales.

Durante el proceso de cosechado por flotación con ozono para las microalgas, se observó la formación de una espuma intensa la cual se asocia con la liberación de proteínas, Figura 13; esto fue confirmado a través de la cuantificación del contenido total de proteínas en el medio acuoso. En este trabajo, el efecto del ozono en la liberación de proteínas totales y en la tensión superficial fue medido en muestras de microalgas cosechadas por flotación con ozono; para lo cual se utilizaron microalgas en su entorno natural (aguas residuales tratadas) y microalgas previamente lavadas. Dicho procedimiento se realizó para eliminar posibles interferencias causadas por los constituyentes presentes en el agua residual, por ejemplo, detergentes.

En la figura 14, se puede observar la liberación de **“proteína en el reactor” durante el proceso de flotación con ozono** para las muestras de microalgas lavadas y no lavadas, se observó un mayor contenido de proteína inicial en las muestras que no fueron lavadas (320 mg/L), en comparación con las muestras lavadas (120 mg/L); lo cual se asocia al contenido de proteínas presentes en el agua residual. Por otra parte, se informó previamente que la formación de espuma durante el proceso contribuyó a la separación y concentración de microalgas (Cheng, et al., 2011; Cheng, et al., 2010).

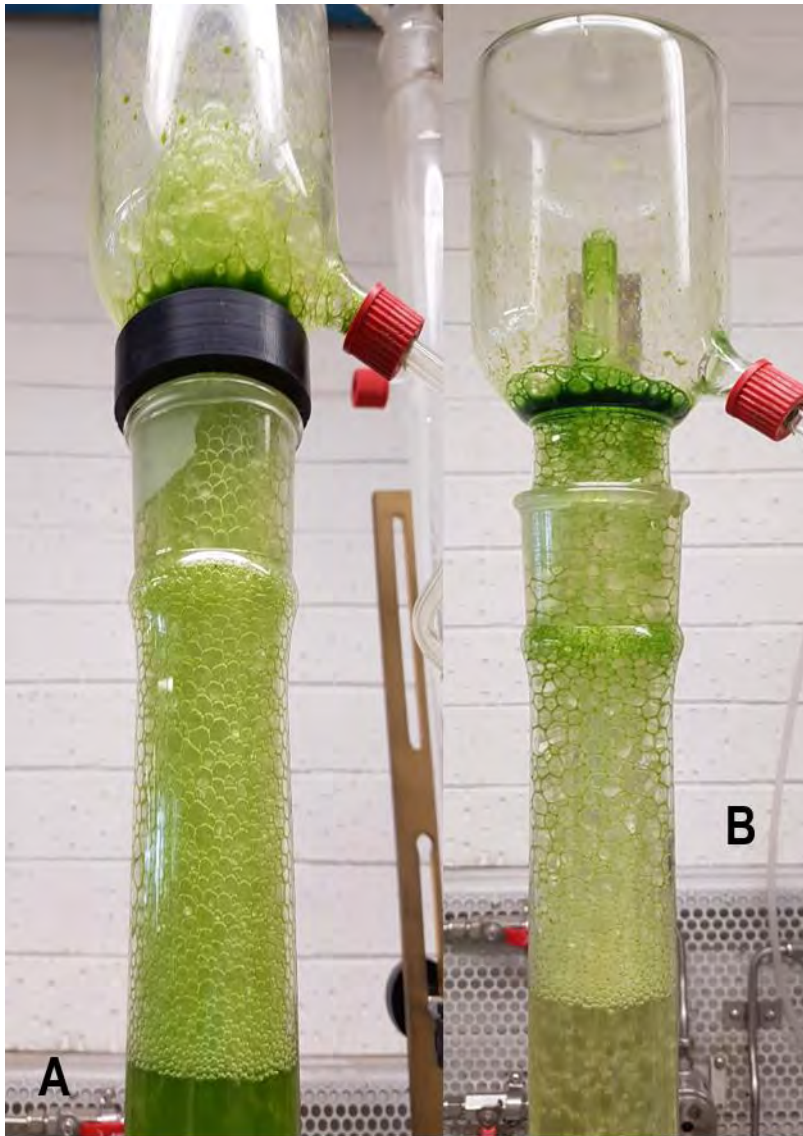


Figura 13 A) Espuma formada durante el proceso de cosechado de microalgas por ozono flotación, B) Gradiente de biomasa en la espuma durante el proceso de cosechado.

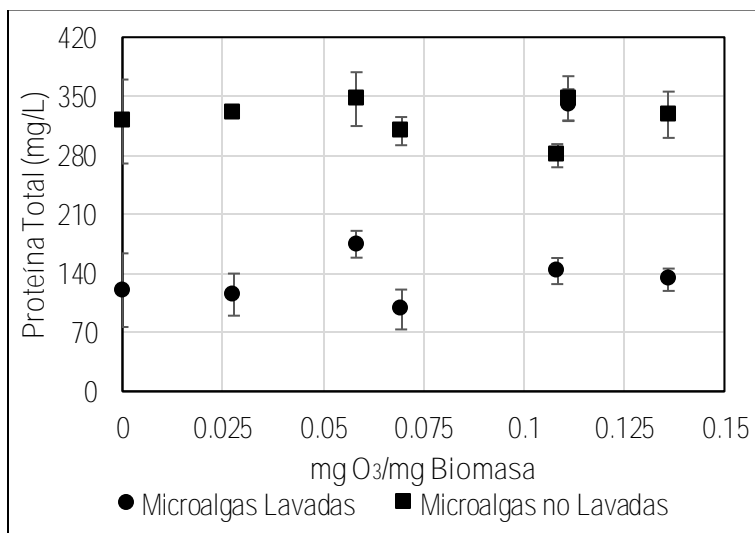


Figura 14 Efecto de la flotación de ozono en la liberación de proteína total a partir de microalgas lavadas y no lavadas.

En este estudio, se observó que el porcentaje de biomasa recuperada y la concentración de "proteína concentrada" aumenta en forma proporcional de acuerdo con la dosis de ozono, en ambas muestras de microalgas (Figura 15). Obteniéndose una relación directa entre la "proteína **concentrada**" y la recuperación de la biomasa. Durante las pruebas realizadas con biomasa lavada se obtuvo **una concentración de "proteína concentrada" de 1.1 g/L (Figura, 15 A), mientras que la "proteína en el reactor fue de 174 mg/L**. De igual forma, durante este experimento se obtuvo una recuperación de aproximadamente el 50% de la biomasa presente.

Por su parte, en el cosechado se obtuvo una concentración máxima de 2.5 g/L de "proteína concentrada" a partir de las microalgas no lavadas al final del proceso de cosechado (Figura, 15 B) y una concentración máxima de **351 mg/L de "proteína en el reactor", lo cual representa la séptima parte de la "proteína concentrada"**. Además de obtener alrededor del 70% de biomasa cosechada.

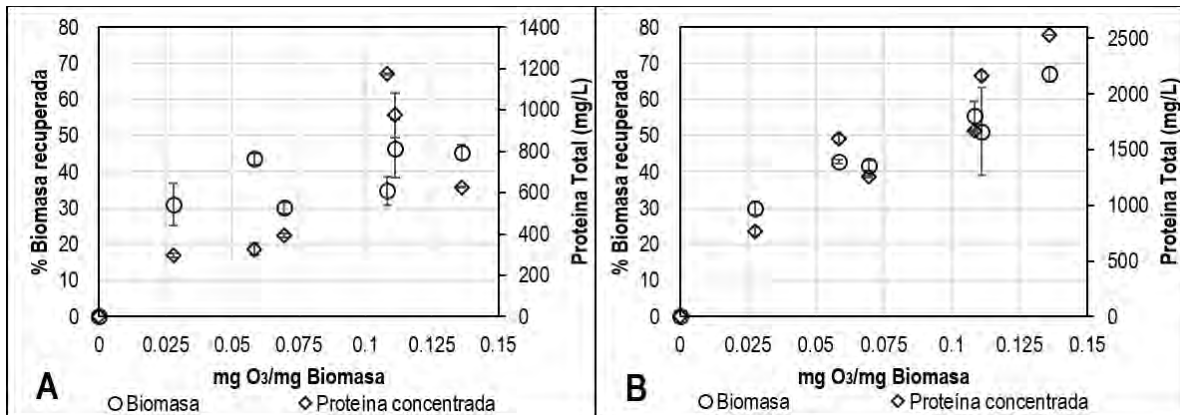


Figura 15 Relación entre la recuperación de la biomasa y la proteína total cosechada durante la flotación con ozono. A) Microalgas lavadas, B) Microalgas no lavadas.

6.1.2 Efecto surfactante de las proteínas de microalgas durante la ozono flotación.

Las proteínas son moléculas anfífilas que reducen la tensión superficial y promueven la formación de espuma (Mulligan, 2005), a través del cual se lleva a cabo la separación de microalgas del medio acuoso. En la Figura 16, se puede observar la disminución de la tensión superficial por efecto de las proteínas presentes en las muestras, la cual se ve favorecida por el aumento de la dosis de ozono. De igual forma, una mayor dosis de ozono produce una mayor concentración de proteína (Figura 15 B). El efecto en la tensión superficial para ambas muestras de microalgas (lavadas y no lavadas) presentaron un comportamiento similar; lo cual se corrobora a través de un análisis de varianza, el análisis indicó que no existe diferencia significativa entre las variaciones en la tensión superficial (p -value= 4.13). Esto significa que los cambios en la tensión superficial son principalmente atribuibles a las proteínas liberadas durante el proceso de flotación con ozono y no a los diversos productos químicos presentes en el agua residual.

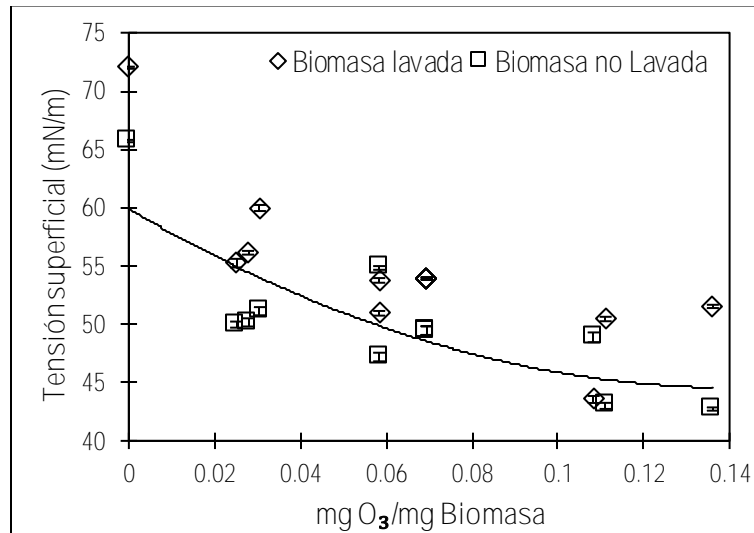


Figura 16 Abatimiento de la tensión superficial en función de la proteína total liberada durante el proceso de flotación con ozono.

Por otro lado, la Figura 17 muestra el efecto de la concentración de proteína en la reducción de la tensión superficial, las muestras tenían una tensión superficial inicial de 65.71 mN/m y 72 mN/m, para las microalgas lavadas y no lavadas respectivamente. La tensión superficial disminuyó hasta valores de 42.73 mN/m para las microalgas no lavadas y 50.04 mN/m en las muestras lavadas. Foegeding et al. (2006) informó que las proteínas en solución reducen la tensión superficial del agua destilada aproximadamente 45 mN/m. Por su parte, Chronakis et al. (2000) mostró una disminución en la tensión superficial a 37.5 mN/m, utilizando proteínas provenientes de microalgas obtenidas por extracción alcalina.

De igual forma, se calculó la concentración micelar crítica (CMC), los resultados indican que una CMC de 550 ± 17 mg/L de proteínas de microalgas son requeridas para reducir la tensión superficial del agua destilada a 42 mN/m, la cual se consigue con una dosis de ozono de 0.025 mg O₃/mg Biomasa. Dosis mayores de ozono produjeron una mayor concentración de tensoactivos, sin embargo, este no produjo efecto significativo en la tensión superficial. Por el contrario, se ha reportado que un aumento en la concentración de proteínas tensoactivas generan espumas más estables y densas (Zayas, 1996). De igual forma se observó, que se requiere un mayor tiempo del proceso de flotación con ozono para completar el cosechado de la biomasa.

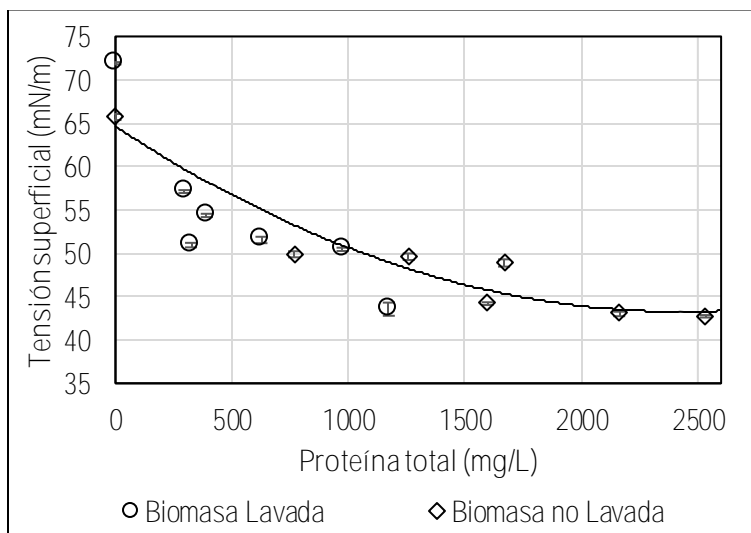


Figura 17 Abatimiento de la tensión superficial en función de la dosis de ozono durante el proceso de flotación con ozono.

6.1.3 Identificación de las proteínas de microalgas liberadas durante el proceso de flotación con ozono

Los resultados de la identificación de proteínas liberadas durante el proceso de flotación con ozono, mediante un gel de electroforesis (SDS-PAGE) se muestran en la Figura 18. Se puede apreciar dos bandas de proteínas con pesos moleculares de 10 y 15 kDa, respectivamente en las muestras de microalgas tratadas por método alcalino (A). Por el contrario, en las muestras sometidas al proceso de ozoflotación, se observaron múltiples bandas de proteínas, dependiendo de la dosis de ozono utilizada. Cuando se utilizaron dosis baja de ozono (Figura 18 B), un número importante de proteínas, con peso molecular entre 10 y 100 kDa, fueron identificadas; siete proteínas son las más relevantes. Cabe destacar el efecto del proceso de flotación con ozono en las proteínas liberadas, se observa que a través de la intensificación de una banda alrededor de los 20-37 kDa; la acumulación en la banda se vio favorecida por el aumento de la dosis de ozono (Figura 18 B, C, D). Esto es atribuible a un mayor daño celular en la microalga, lo cual permite una mayor liberación de proteínas. Por otra parte, las bandas de aproximadamente 75 kDa observadas a dosis de 0.0695 mg O₃/mg Biomasa, desaparecieron con dosis mayores de ozono (0.136 mg O₃/mg Biomasa). El probable que esto se atribuya a la posible oxidación de las proteínas.

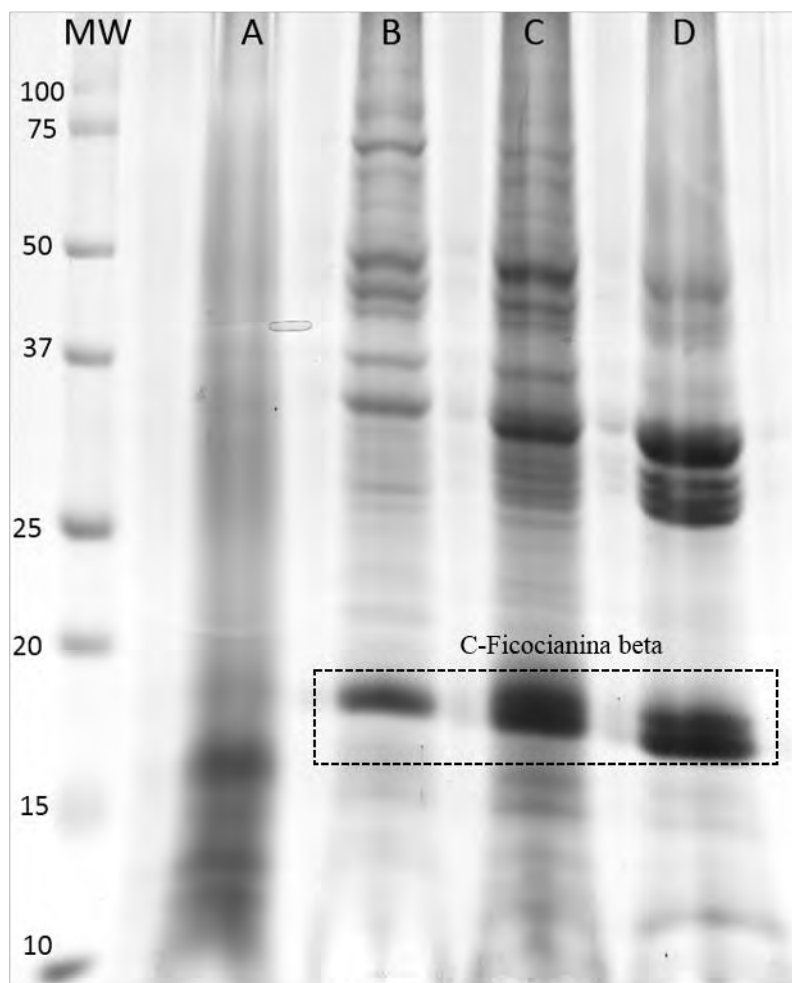


Figura 18 Gel de SDS-PAGE para muestras de proteínas de microalgas: MW) Marcador de peso molecular (Bio-Rad), Dual Color (kDa); A) Método alcalino, B) 0.0695 mg O₃/mg Biomasa, C) 0.1082 mg O₃/mg Biomasa y D) 0.136 mg O₃/mg Biomasa.

A través de la identificación por espectrometría de masas tándem (LC/MS/MS), se logró identificar en el extracto alcalino (A) la proteína RuBisCo (Ribulosa-1, 5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, 56 kDa). Esta proteína está contenida en los carboxisomas de las cianobacterias del género *Cyanothece* sp (Moroney & Somanchi, 1999). Otras proteínas similares a RuBisCo fueron identificadas en el extracto alcalino, tal como la cadena beta aloficocianina (17 kDa) y la cadena alfa C-ficocianina (17.3 kDa), de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.

Por otra parte, la banda proteínica obtenida después del proceso de flotación con ozono (Figura 18 B, C, y D) que presentaba mayor intensidad fue identificada como la cadena beta C-ficocianina con un peso molecular de 18 kDa, es una biliproteína (pigmento) que normalmente se encuentran en la pared celular de las cianobacterias (Chaiklahan, et al., 2011). Estos resultados sugieren que el ozono actúo sobre la pared celular, que contiene la cadena beta C-ficocianina. De ello se desprende que, el proceso de flotación con ozono favorece la liberación de proteínas tensoactivas, situados en la pared celular de microalgas.

6.1.4 Recuperación de lípidos y biomasa por flotación con ozono

De igual forma, durante esta primera fase de experimentación se evaluó la eficiencia del proceso de cosechado en la recuperación de biomasa y lípidos. Los resultados obtenidos fueron comparados con la literatura existente, por ejemplo, estudios previos realizados por Velásquez-Orta et al. (2014) encontraron que una máxima recuperación de biomasa (79%) y lípidos (12%) cuando se utilizó una dosis de 0.23 mg O₃/mg Biomasa. Además, estos estudios revelaron que una dosis mayor a 0.24 mg O₃/mg Biomasa disminuyó la recuperación de los lípidos.

En este trabajo, se estudió la flotación con ozono usando dosis de ozono bajas (0,023-0,123 mg O₃/mg Biomasa) y usando la concentración micelar crítica (CMC) de la proteína surfactante como punto de partida. La Tabla 6, muestra el efecto de las variables analizadas (concentración de ozono y el tiempo de ozonización) en la recuperación de la biomasa (TSS%) y lípidos (%).

Tabla 6 Importancia experimental de las variables probadas en el proceso de flotación con ozono, Nivel de significancia fue de 95%.

	Recuperación de biomasa, SST (%)		Recuperación de lípidos (%)	
	F-ratio	P-value	F-ratio	P-value
A: Concentración de ozono	79.91	0.0000	0.41	0.5432
B: Tiempo de flotación con ozono	52.09	0.0002	64.88	0.0001
AA	1.16	0.3176	16.50	0.0048
AB	11.40	0.0118	5.31	0.0547
BB	0.04	0.8411	16.36	0.0049

A partir del análisis estadístico realizado a los datos obtenidos, se encontró que el porcentaje de recuperación de la biomasa (SST) se ve afectado por tres efectos importantes, en el siguiente orden: concentración de ozono (A), con un p-value de 0.000; tiempo de flotación con ozono (B), con un p-value de 0.002; y finalmente, la interacción AB, con un p-value de 0.01. Del mismo modo, se encontró que el tiempo de flotación con ozono (B) tiene un efecto significativo en la recuperación de lípidos (valor de p < 0.05). De acuerdo con los diagramas de Pareto (resultados no mostrados), la variable B afectada negativamente la recuperación de los lípidos.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 19, a través del modelo de superficie de respuesta obtenido, se encontró que la máxima recuperación de biomasa del 75%, se logra con una concentración de ozono de 7.53 mg O₃/L y un tiempo de flotación con ozono de 37.6 min, equivalente a una dosis de 0.142 mg O₃/mg Biomasa. Por su parte, la recuperación de lípidos más alto del 16%, se consiguió con una dosis baja de ozono 0.047 mg O₃/mg Biomasa, comparado a cuando se utiliza centrifugación como método de cosecha (8% de lípidos). Los resultados de la recolección de la biomasa y la recuperación de los lípidos fueron similares a los reportados por Velásquez-Orta et al. (2014), pero usando de 1.6 a 4.9 veces menos la dosis de ozono. En estudios anteriores, Cunha et al. (2011) observó que dosis alta de ozono producen la oxidación de lípidos, por esta razón, dosis bajas de ozono se eligieron para permitir la lisis de la membrana microalgal para la liberación de proteínas de tensoactivas (recuperación de la biomasa) y la recuperación de lípidos evitando la oxidación de lípidos.

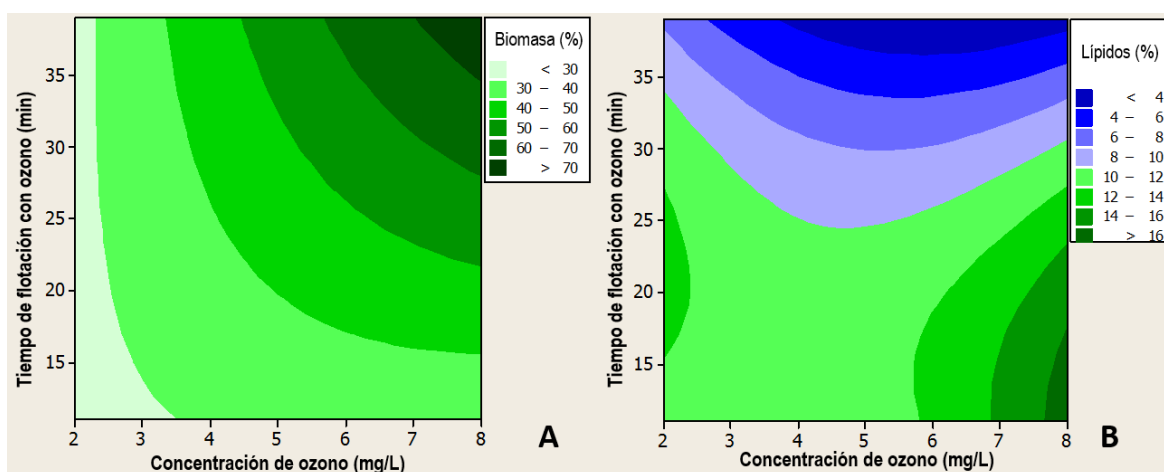


Figura 19 Superficie de respuesta para la recuperación de biomasa (A) y lípidos (B) en función de la concentración de ozono (2-8 mg/L) y el tiempo de flotación con ozono (10-40 min).

Por otra parte, la Figura 20 muestra que una mayor recuperación de la biomasa de microalgas (Figura 20 A) no tiene como resultado un aumento en la recuperación de lípidos (Figura 20 B). De hecho, la recuperación de lípidos disminuyó con una dosis creciente de ozono (≥ 0.058 mg O₃/mg Biomasa). El mismo comportamiento se informó por Velásquez-Orta et al. (2014), pero con dosis de ozono más altas (≥ 0.25 mg O₃/mg Biomasa). La Figura 20 C por su parte, muestra que la biomasa cosechada tenía un contenido de lípidos más bajo cuando se recuperan a dosis más altas de ozono. La reducción de lípidos se puede atribuir a una posible peroxidación lipídica. Se ha informado que el principal objetivo para la peroxidación de lípidos se produce en ácidos grasos insaturados. La peroxidación de lípidos se observó previamente con tiempos de exposición al ozono prolongado (20-30 min) (Cunha, et al., 2011; Vaultier & Jolivet, 2015).

Teniendo en cuenta la eficiencia del proceso (Figura 20 D), los mejores resultados para la recuperación de biomasa y lípidos se obtuvieron con dosis bajas de ozono ($0.028 \text{ mg O}_3/\text{mg Biomasa}$). Estos resultados fueron consistentes con los reportados en la literatura para la recuperación biomasa microalgal (Cheng, et al., 2011; Cheng, et al., 2010; Betzer, et al., 1980). Sin embargo, la relación entre la biomasa cosechada y la recuperación de lípidos por la flotación con ozono es aún incipiente. Estos resultados indican que incluso a bajas dosis de ozono la recuperación de lípidos se ve afectada (Figura 20 C). Parece que la alta exposición al ozono, ya sea por el uso de altas dosis, altas concentraciones de ozono en fase gas o por el tiempo de oxidación prolongado, afecta negativamente a la cantidad de lípidos extraídos de la biomasa de microalgas cosechado.

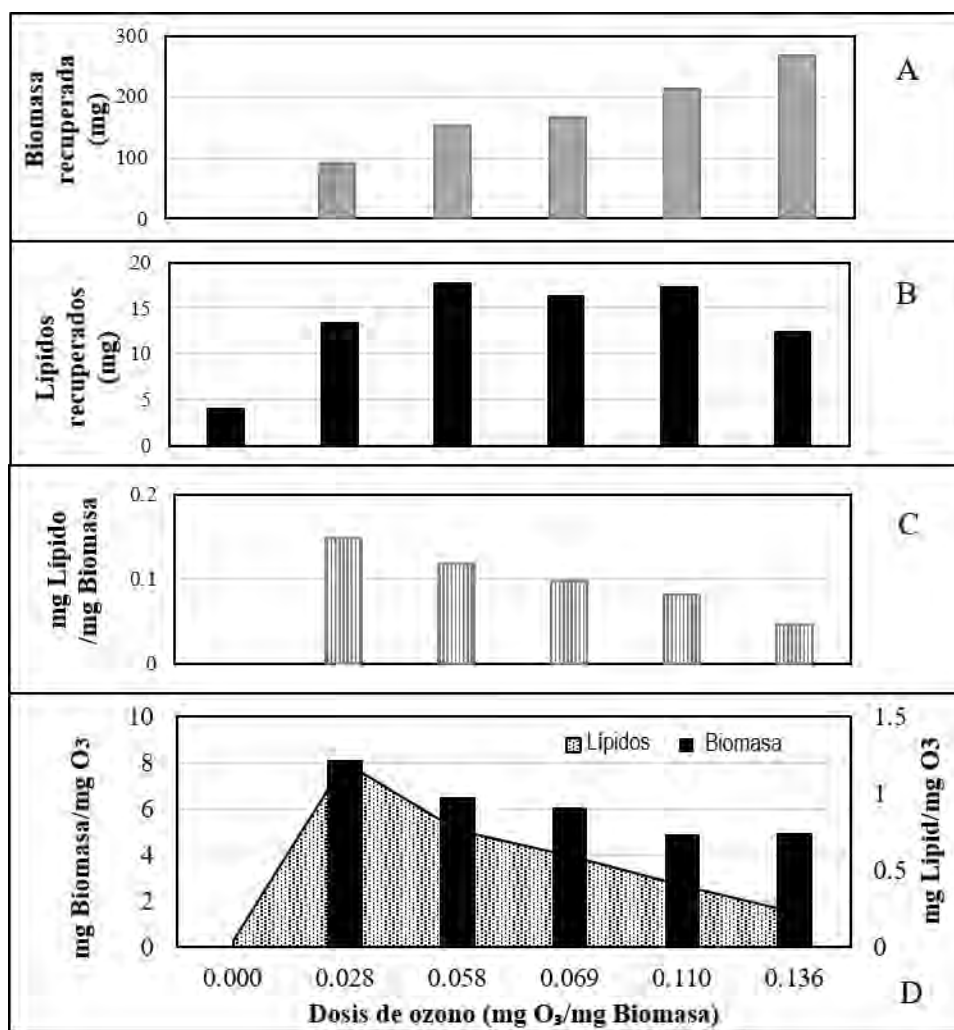


Figura 20 Efecto de la dosis de ozono en: A) Biomasa recuperada, B) Lípidos recuperados, C) Recuperación de lípidos por biomasa, D) Eficiencia de recuperación.

6.2 Cosecha de microalgas cultivadas en agua residual mediante la flotación con ozono como pretratamiento, seguido de la flotación con aire.

6.2.1 Efecto del pretratamiento con ozono en el potencial zeta y en la producción de tensoactivos a partir de las microalgas.

Durante esta fase de experimentación se probó la flotación con ozono como un pretratamiento para el proceso de cosechado de biomasa, seguido de la flotación con aire. Es importante mencionar que durante esta experimentación se probó el efecto de la concentración de la biomasa (mg SST/L), la concentración de ozono (mg/L) y el tiempo de pretratamiento (min), en las variables de respuesta del potencial zeta de la muestra (mV), la producción de tensoactivo (mg PT/L) y el porcentaje de biomasa recuperada (%). Cabe resaltar que las condiciones de operación del proceso de flotación con ozono fueron modificadas en función de los resultados obtenidos previamente.

En la literatura, se ha reportado que un impedimento para el cosechado de la biomasa microalgal es su carga superficial, la cual, se reporta a través de la medición del potencial zeta. Este valor es propio de cada una de las especies de microalgas, la edad y las condiciones de cultivo (Gerardo, et al., 2015). Durante este trabajo, se observó que el cultivo mixto compuesto principalmente por *Scenedesmus obliquus* en agua residual presentó un valor promedio de potencial zeta de -25.5 mV. Dicho valor se vio afectado por el pretratamiento con ozono, como se muestra en la Figura 21. Se observó, que durante el proceso de pretratamiento el potencial zeta aumento a bajas dosis de ozono aplicadas; sin embargo estos valores variaron en función de la concentración de la biomasa y de ozono. El mayor aumento del potencial zeta (-11.2 mV) se logró con una dosis aplicada de 0.017 mg O₃/mg Biomasa, una concentración de ozono de 10 mg/L y 300 mg SST/L, Figura 21 A. De igual forma se observó, que para una concentración mayor de biomasa (600 mg SST/L) la desestabilización de la partícula se llevó a cabo a los 2 primeros minutos (0.009 mg O₃/mg Biomasa) del proceso de pretratamiento con ozono (Figura 21 D).

Por otra parte, se observó una disminución del potencial zeta a partir de una dosis de ozono de 0.023 mg O₃/mg Biomasa (3 min de flotación con ozono); dicho efecto ya fue reportado por Cheng, et al. (2011, 2010), dichos autores reportaron una disminución en el potencial zeta de *Chlorella vulgaris* de -6 a -11 mV con una dosis de ozono de 0.005 mg O₃/mg Biomasa, mientras que para *Scenedesmus obliquus* reportaron una disminución de -7 a -15 mV con una dosis de ozono de 0.2 mg O₃/mg Biomasa. Sin embargo, Nguyen, et al. (2013) reportó un aumento en el potencial zeta de *Chlorella sp.* de -18.1 a -14.6 mV cuando se utilizaron 5 min de ozono a una concentración de 34 mg/L como pretratamiento.

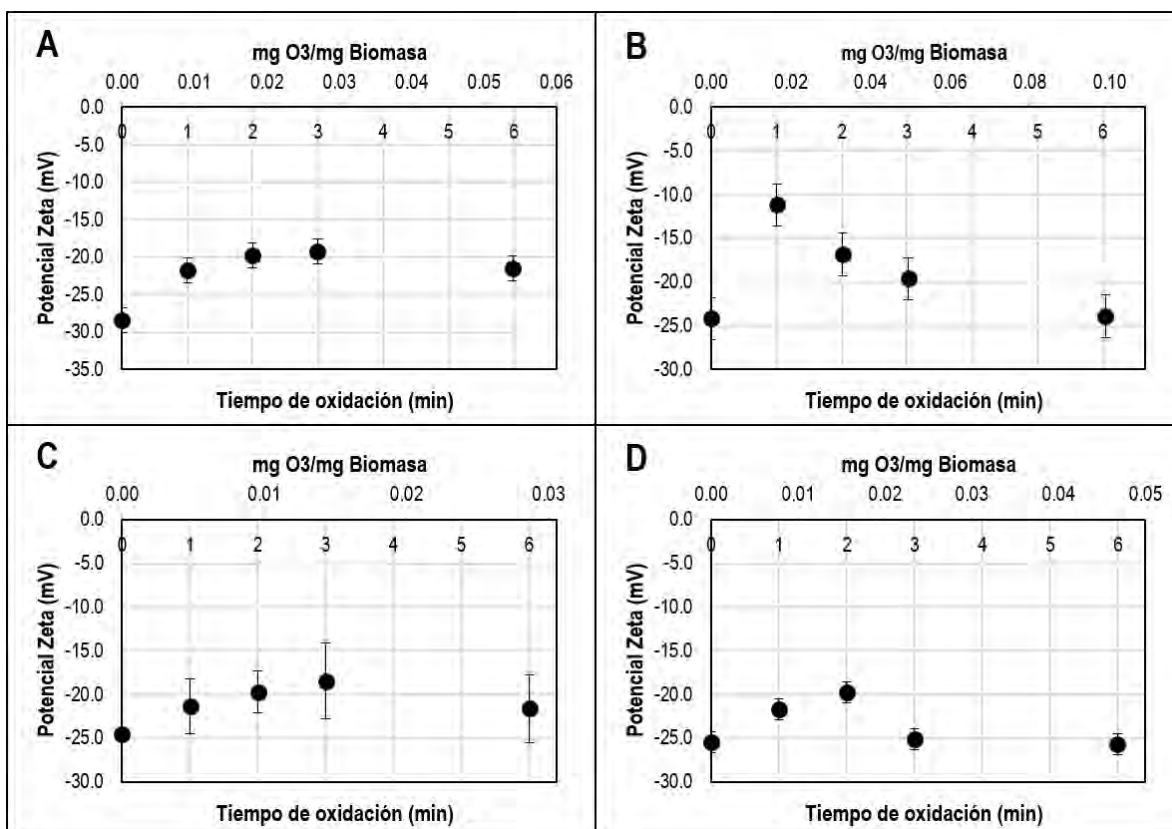


Figura 21 Efecto de la flotación con ozono en el potencia zeta, condiciones de proceso: A) 300 mg Biomasa/L y 5 mg O₃/L; B) 300 mg Biomasa/L y 10 mg O₃/L; C) 600 mg Biomasa/L y 5 mg O₃/L y D) 600 mg Biomasa/L y 10 mg O₃/L.

Por otra parte, se evaluó la liberación del tensoactivo proteínico durante el proceso de pretratamiento con ozono, la concentración inicial de la proteína en el medio acuoso vario en función de la concentración de la biomasa deseada para este experimento. El cultivo que presentaba una concentración microalgal de 300 mg SST/L, tenía una concentración de proteína total promedio de 450 mg PT/L, mientras que el cultivo de 600 mg SST/L presentaba una concentración promedio de 350 mg PT/L, Figura 22. Cada una de las condiciones probadas durante la experimentación provoco un incremento en la concentración de la proteína total por efecto de la utilización del ozono como pretratamiento. Sin embargo, cuando se probó una concentración biomasa de 300 mg SST/L y una concentración de ozono de 10 mg/L, la concentración de la proteína total en el reactor se incrementó durante el primer minuto de flotación con ozono hasta 493.5 mg PT/L. Por su parte, las pruebas de cosechado con una concentración de biomasa microalgal de 600 mg SST/L, produjo un máximo de 388.6 mg PT/L hasta los 3 min de proceso de flotación con ozono.

Posteriores dosis de ozono no produjeron una mayor concentración de proteína total remanente en la columna, lo cual se atribuyó a que las proteínas liberadas fueron cosechadas junto con la biomasa microalgal, ya que el cosechado de biomasa presentaba una concentración de proteína total de 1.93-2.91 g/L.

Como se mencionó previamente una concentración micelar crítica (CMC) de 550 mg/L de proteína liberada de microalgas, produjo el abatimiento de tensión superficial hasta 42.73 mN/m, favoreciendo así la recuperación de la biomasa microalgal. De igual forma se observó previamente que concentraciones inferiores a la CMC producían cambios en la tensión superficial.

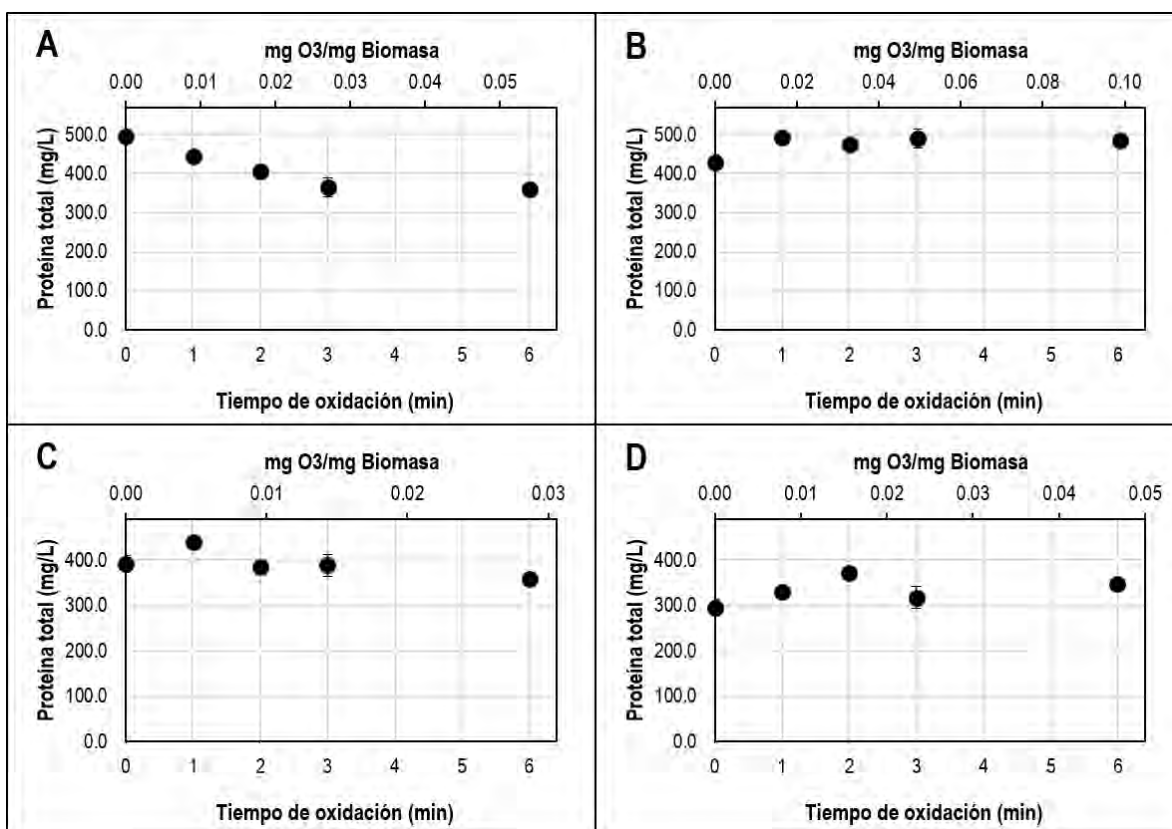


Figura 22 Efecto de la flotación con ozono en la liberación de tensoactivo proteínico, condiciones de proceso: A) 300 mg Biomasa/L y 5 mg O₃/L; B) 300 mg Biomasa/L y 10 mg O₃/L; C) 600 mg Biomasa/L y 5 mg O₃/L y D) 600 mg Biomasa/L y 10 mg O₃/L.

6.2.2 Propuesta de mecanismo de reacción del proceso de pretratamiento del ozono con la biomasa.

En función a los resultados obtenidos de potencial zeta y proteína total liberada, se pudo establecer las posibles reacciones que se involucran durante el proceso de pretratamiento con ozono y la biomasa microalgal. Es importante mencionar que los cultivos de microalgas presentaron un pH de 9.2 ± 0.5 .

Durante el proceso de pretratamiento con ozono, se produce un primer contacto del ozono con todo aquello que rodea la microalga, se observó que los cultivos de microalgas utilizados presentaban la formación de flóculos microalgas-materia orgánica (Figura 23). La desestabilización inicial de las microalgas se produce durante el proceso de pretratamiento con ozono, lo cual incrementa el potencial zeta del sistema (-25 a -10 mV). **Esto debido a la reacción entre los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) formados por las condiciones de pH del medio de reacción y los compuestos orgánicos que recubren la microalga, teniendo como productos de reacción la desorción del recubrimiento orgánico, compuestos de menor peso molecular, y la reducción de la barrera electrostática de la partícula (Jekel, 1994), de igual forma, se ha reportado que la desorción de materia orgánica sobre las partículas favorece el incremento de la carga superficial en partículas (Liang, et al., 2014), Figura 24, reacción 1.**

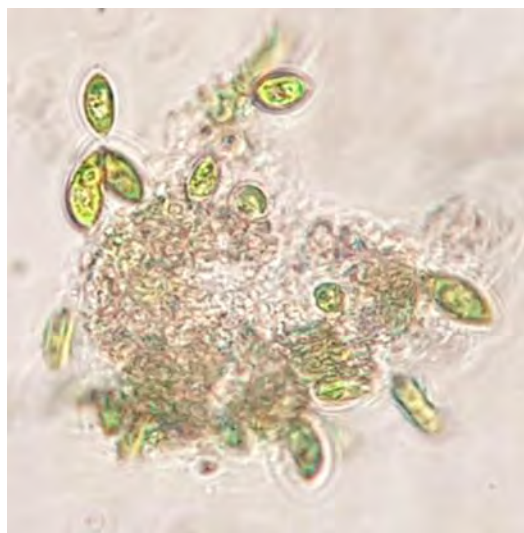


Figura 23 Flóculos microalgas-materia orgánica presentes en el cultivo de microalgas. Observados con un objetivo de 40x.

Posteriormente, el grupo hidroxilo estaría en contacto con los grupos funcionales presentes en la superficie de la microalga en este caso con: carboxilatos ($-\text{COO}^-$) y aminas primarias ($-\text{NH}_2$) (Ozkan & Berberoglu, 2013). Sin embargo, se ha reportado que moléculas con alto grado de grupos carboxilatos presentaron poca reactividad

en presencia de oxidación con ozono a pH 9 (These & Reemtsma, 2005), sin embargo, largos periodos de oxidación tendría como resultado la mineralización del grupo (Debono, et al., 2013). Por su parte, la oxidación del grupo amina con el radical hidroxilo, tiene como producto principal la formación del catión radical amino NH_2^+ . Dicha reacción se favorece a un pH 9 y en la presencia de un grupo amina desprotonado. Sin embargo, el radical es rápidamente fragmentado, manteniéndose el grupo amina (von Gunten, 2003; Bonifacic, et al., 1998). Por lo que se podría asumir que, en los tiempos aplicados de ozono como pretratamiento, el ozono no reaccionó con los grupos superficiales de la microalga, Figura 24, reacción 2.

Finalmente, el oxidante ($\text{OH}\cdot$) estaría en contacto con la pared celular de la microalga. Cardeña et al. (2017) observó la lisis producida en la microalga por efecto de los radicales hidroxilo. Plummer et al. (2002) reportó que la lisis de la microalga se producía a partir de una concentración de ozono de 8mg/L. De igual forma, otros autores reportan el daño causado en la pared de la microalga a través de la liberación de materia intracelular o como un método de pretratamiento para la extracción de lípidos (Velasquez-Orta, et al., 2014), Figura 24, reacción 3. El daño producido por el oxidante produjo la liberación de proteína total presente en la microalga (493.50 mg/L), se ha reportado que la materia orgánica proveniente de la microalga, produce el incremento de la carga negativa de la superficie celular (Henderson, et al., 2010). Por lo que a dosis superiores de 0.02 mg O_3/mg Biomasa, se presenta una disminución del potencial zeta (-10 a -26 mV). Se puede apreciar que el incremento en la concentración de la proteína total en el reactor se produce hasta que se alcanza el menor valor de potencial zeta (Figura 25).

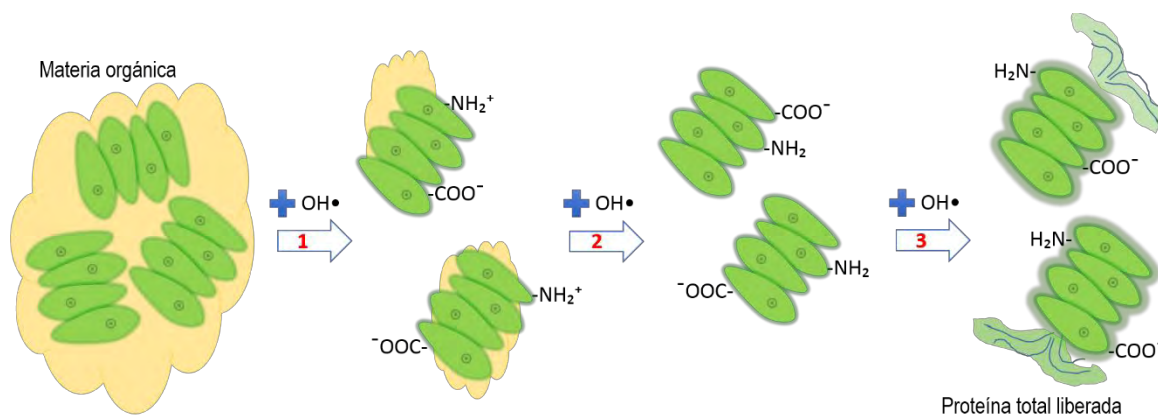


Figura 24 Propuesta de mecanismo de reacción para el pretratamiento de *Scenedesmus obliquus* con ozono a un pH de 9.2 ± 0.5

6.2.3 Efecto del pre-tratamiento en la cosecha de biomasa microalgal

A continuación, se presentan el efecto del pretratamiento en el porcentaje de recuperación de la biomasa microalgal por flotación ozono-aire, comparados con la flotación con ozono convencional.

En la Figura 25, se puede observar el efecto de la dosis de ozono, el potencial zeta y la generación de tensoactivo en la recuperación de la biomasa. Para todas las condiciones de operación probadas se puede observar que la recuperación de la biomasa alcanza su mayor punto, hasta que se presenta la desestabilización de la microalga (**incremento del ζ**). De igual forma, se puede observar que la recuperación de la biomasa se mantiene constante a partir de la desestabilización de las microalgas, lo cual puede ser atribuido a la presencia de tensoactivo proteínico.

La desestabilización de las microalgas y la liberación de tensoactivo se produjo a dosis inferiores de 0.02 mg O_3 /mg Biomasa, lo cual esta atribuido a un tiempo máximo de pretratamiento de 2 min. Durante la evolución del proceso de cosechado, se puede observar que la proteína en el medio acuoso alcanza su punto máximo y posteriormente decrece, lo cual puede ser atribuible al cosechado de la proteína. El cosechado presentaba una concentración de proteína total de 2-3 g/L.

Previamente, se mencionó la importancia de la generación de tensoactivo para llevar a cabo la disminución de la tensión superficial del sistema favoreciendo la formación de la espuma durante el proceso de cosechado, sin embargo, se puede observar a partir de la Figura 25, que es necesario llevar a cabo la desestabilización de las microalgas para empezar con el cosechado de la biomasa.

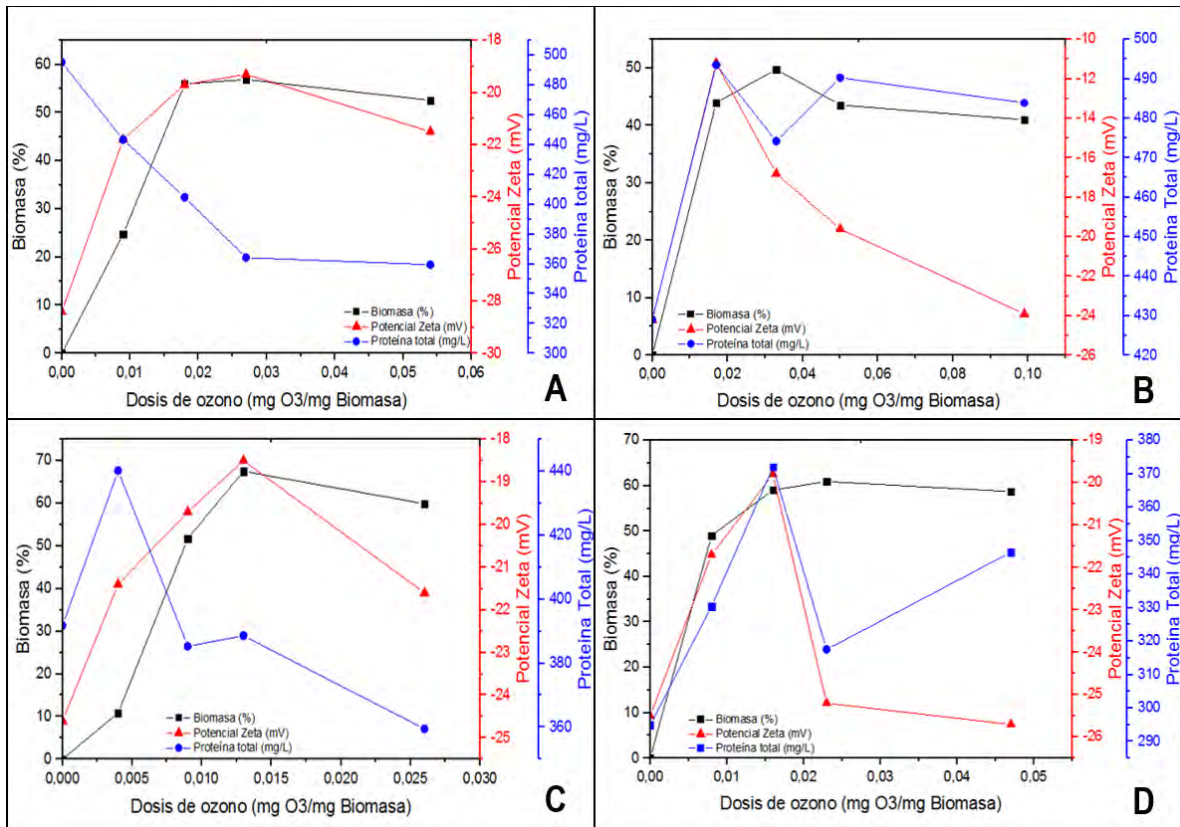


Figura 25 Porcentaje de recuperación de la biomasa microalgal en función de la estabilidad de la microalga y la liberación de tensoactivo proteínico.

Como se mencionó los experimentos de cosechado fueron realizados utilizando ozono y aire como gas de dispersión. Para ello, se evaluó la implementación de estos gases en la recuperación de la biomasa. Cuando se utilizó solo aire como gas de dispersión en el proceso de flotación no se obtuvo cosechado de la biomasa microalgal, lo cual es consistente con lo reportado con Cheng, et al., (2011, 2010). Cuando se implementó ozono como pretratamiento seguido de la flotación con aire se obtuvieron resultados favorables de cosechado. En la Figura 26 se puede observar el porcentaje de biomasa cosechada por cada uno de los gases de dispersión utilizados, de igual forma, se puede apreciar las pérdidas que se producen durante el cosechado por flotación ozono-aire; las cuales se atribuyen a la liberación de materia intracelular o a la oxidación de la biomasa. Las muestras que presentaban una menor concentración (300 mg/L) de microalgas obtuvieron una mayor pérdida de biomasa, Figura 26 A y B.

Por otra parte, se observó que durante la flotación ozono-aire, conforme aumenta la dosis de ozono una mayor cantidad de biomasa es recuperada por este gas. Una dosis de ozono de 0.0078-0.0234 mg O₃/mg Biomasa, seguida de la flotación con aire se recupera del 49-60% de la biomasa inicial. Sin embargo, cuando solo se utilizó ozono como gas acarreador (0.0468 mg O₃/mg Biomasa) se obtuvo una recuperación del 59%. En función de estos resultados y a través de ANOVA se concluyó que no existía diferencia significativa entre la recuperación de la biomasa microalgal cosechada por flotación con ozono y la flotación ozono-aire (p-value=2.2). Por lo tanto, la utilización de la flotación con aire contribuye a la disminución el ozono utilizado hasta en un 50%, Figura 26 D.

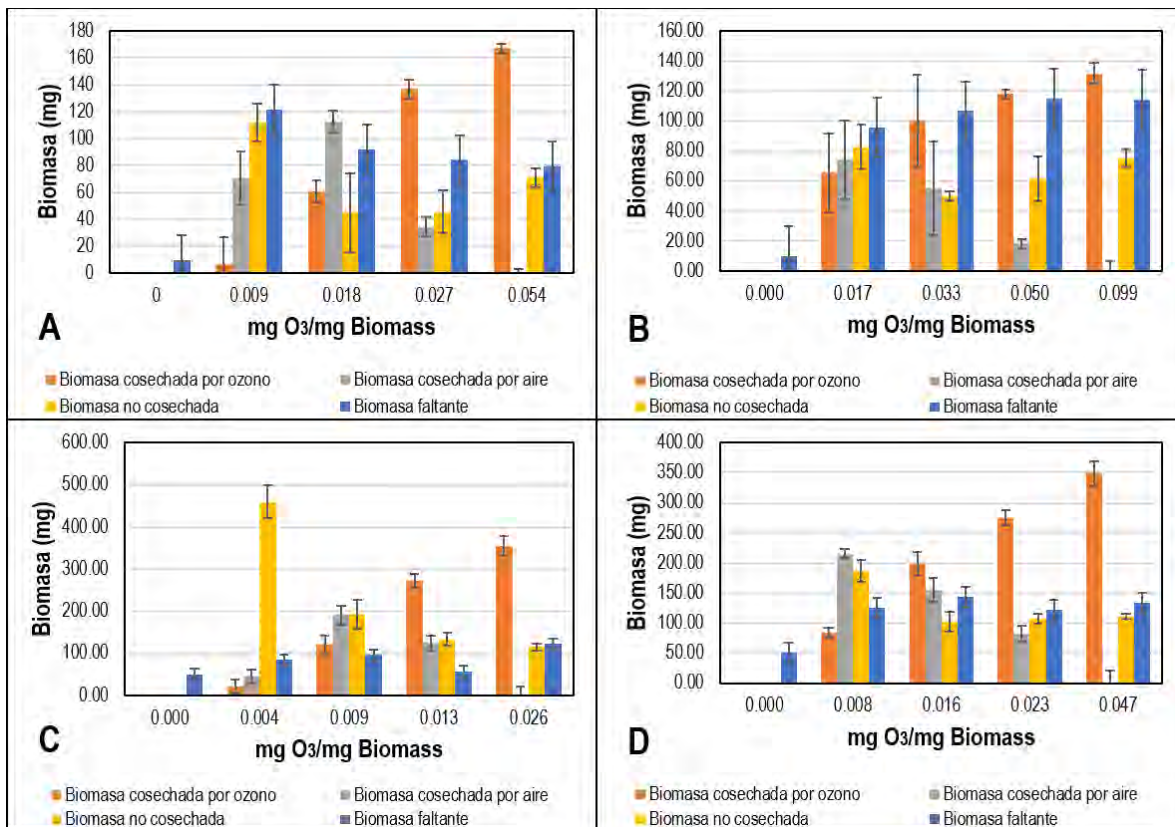


Figura 26 Biomasa cosechada durante el proceso de flotación con ozono aire. A) Biomasa: 300mg/L y C O₃ Entrada: 5mg/L; B) Biomasa: 300mg/L y CO₃ Entrada: 10mg/L; C) Biomasa: 500mg/L y CO₃ Entrada: 5mg/L y D) Biomasa: 500mg/L y C O₃ Entrada: 10mg/L.

Para observar que factores influyeron en la recuperación de la biomasa durante esta fase experimental se realizó un análisis de varianza multifactorial (Tabla 7), se tomó un nivel de significancia del 95%. Se obtuvo que la concentración de la microalgas inicial y la concentración de ozono no producen cambios significativos en el proceso de cosechado. Sin embargo, el factor de tiempo de pre-tratamiento con ozono presenta una diferencia significativa en la recuperación de la biomasa (P-value 0.0421). Además, la gráfica de Pareto presentó que el tiempo de flotación influye de manera positiva (gráfica no presentada). La Figura 27, presenta una gráfica de caja donde se puede apreciar que solo el tiempo de un minuto de pretratamiento con ozono es significativamente diferente a los restantes probados. Por lo tanto, se puede decir que se necesita un tiempo mínimo de dos minutos de pretratamiento para llevar a cabo la recuperación de la biomasa, a partir de dicho tiempo no se produce un cambio significativo en la recuperación de la biomasa microalgal, bajo las condiciones probadas.

Tabla 7 Importancia experimental de las variables probadas en el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.

Factores	F-Ratio	P-value
Concentración de biomasa (mg/L)	1.15	0.3087
Concentración de ozono (mg/L)	0.32	0.5856
Tiempo flotación con ozono (min)	3.97	0.0421

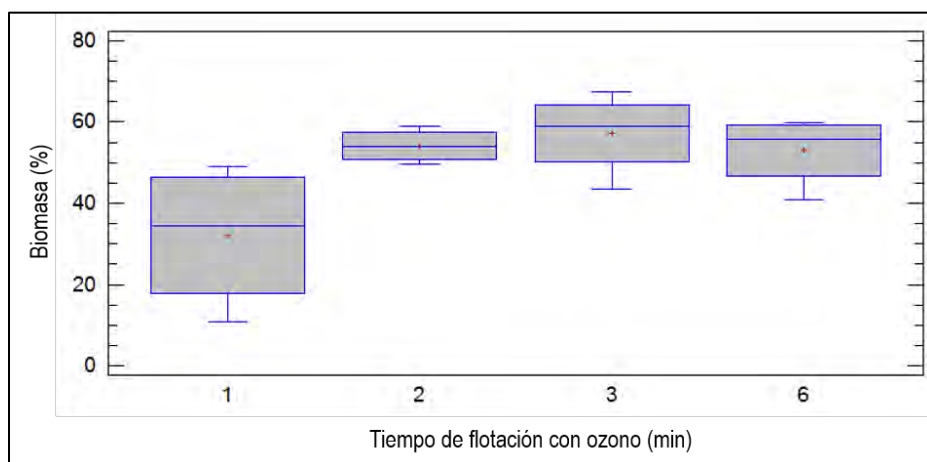


Figura 27 Grafica de cajas para la recuperación de la biomasa en función del tiempo de pre-tratamiento.

Por otra parte, la Tabla 8, muestra la comparación entre los resultados obtenidos durante esta fase experimental y los reportados en la literatura. Cabe destacar que hasta la fecha no se han reportados trabajos donde se utilice la flotación con ozono-aire para la recuperación de la biomasa microalgal. Se puede observar que trabajos reportados en la literatura (Velásquez-Orta, et al., 2014; Cheng, et al., 2011), tienen porcentajes de recuperación de biomasa superiores al 80%. Sin embargo, las dosis de ozono utilizadas por estos autores son superiores hasta 20 veces a las utilizadas en este trabajo de investigación.

Tabla 8 Comparación de los resultados obtenidos con la literatura publicada.

Este trabajo de investigación	Este trabajo de investigación	Velásquez-Orta (2014)	Cheng (2011)
[Biomasa]= 300 mg/L [O3]= 5 mg/L DOA= 5.4 mg/L Tiempo oxidación= 2 min Tiempo aireación= 4 min	[Biomasa]= 600 mg/L [O3]= 10 mg/L DOA= 9.4 mg/L Tiempo oxidación= 3 min Tiempo aireación= 4 min	[Biomasa]= 400 mg/L [O3]= 45 mg/L DOA= 94.7 mg/L Tiempo oxidación= 5 min Tiempo aireación= 0 min	[Biomasa]= 1,610 mg/L [O3]= 63, 98, 135 mg/L DOA= 837.2 mg/L Tiempo oxidación= 4 min Tiempo aireación= 0 min
Recuperación (%)= 56.9 Concentrado de la biomasa= 17.2 veces Volumen del concentrado= 10mL 0.027 mgO ₃ /mgBiomasa	Recuperación (%)= 67.5 Concentrado de la biomasa= 12.4 veces Volumen del concentrado= 30mL 0.0234 mgO ₃ /mgBiomasa	Recuperación (%)= 80 Concentrado de la biomasa= 48 Volumen del concentrado= 20mL 0.23 mgO ₃ /mgBiomasa	Recuperación (%)= 95 Concentrado de la biomasa= --- Volumen del concentrado= --- 0.52 mgO ₃ /mgBiomasa

6.3 Optimización de las condiciones de operación del sistema de cosechado microalgal mediante flotación por ozono-aire.

6.3.1 Efecto de la dosis de ozono y el flujo de aire en el proceso de cosechado.

Con base en los resultados obtenidos, se obtuvo que para una concentración de microalgas de 600 mg/L la desestabilización del cultivo por efecto del pretratamiento con ozono ocurre a partir del tercer minuto. Asimismo, se obtuvo que un pretratamiento de 2-6 min de ozono (flotación con ozono) no producía cambios significativos en la recuperación de la biomasa cuando se utilizaba una concentración de ozono de 10 mg/L. De igual forma, es importante mencionar que la dosis de ozono ($\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$) se estableció como un factor a variar, debido a que anteriormente se observó que la concentración de inicial de microalgas en el cultivo no presenta diferencia significativa en la recuperación de la biomasa. Cabe destacar que, fijando este factor, la concentración de microalgas y la concentración de ozono, se obtiene un valor definido del tiempo de pretratamiento.

Durante esta fase de experimentación, se evaluó el proceso de cosechado en función de las variables experimentales de dosis de ozono ($\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$) y flujo de aire (L/min). Y se tuvo como factor de respuesta el rendimiento de recuperación de biomasa (%) y el contenido de lípidos ($\text{mg Lípidos}/\text{mg Biomasa}$).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el rendimiento de biomasa cosechada y la biomasa remanente en la columna, esta última es la biomasa que no ha sido cosechada durante el proceso de flotación ozono-aire. Como se puede observar en la Figura 28, la dosis de ozono de 0.04 $\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$, solo produjo la recuperación en promedio del 15% de la biomasa presente en el reactor; mientras que una dosis superior, es decir, dosis 0.06 $\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$ obtuvo una recuperación del 46%.

Cabe recordar que estos experimentos se realizaron bajo condiciones establecidas de concentración de microalgas (750 mg/L) y concentraciones de ozono gas (15 mg/L), por lo que el factor tiempo de flotación con ozono incrementa para dosis de ozono superiores. Como se mencionó en la fase anterior de experimentación, el incremento en el tiempo de flotación con ozono favorece la recuperación de la biomasa.

Por otra parte, se puede observar que el flujo de aire beneficia la recuperación de la biomasa, ya que con un flujo de 1.5 L/min se tiene una recuperación del 47%, en comparación con un flujo de 0.5 L/min, donde solo se recuperó el 35%, lo anterior cuando se utilizó una dosis de ozono de 0.06 $\text{mg O}_3/\text{mg Biomasa}$. Dicho efecto ya fue reportado anteriormente por Phoochinda, et al. (2003), quienes encontraron que el incremento en la tasa de aireación favorece la recuperación de la microalga *Scenedesmus quadricauda* cuando se utiliza la flotación con aire combinada con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

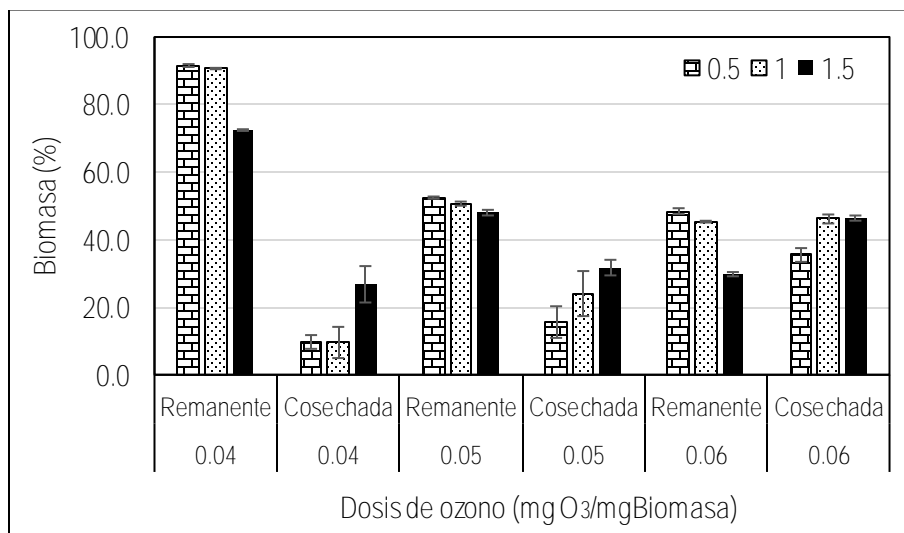


Figura 28 Efecto de la dosis de ozono y el flujo de aire en la recuperación de la biomasa.

Por otra parte, se evaluó el efecto de los factores de cosechado antes mencionados en función del contenido lipídico final de la biomasa cosechada, cuyo contenido inicial antes de la cosecha era de 0.096 mg Lípidos/mg Biomasa. La Figura 29, muestra el contenido lipídico en la biomasa cosechada y en la biomasa remanente. Se puede observar que la dosis de ozono favorece la cantidad de lípidos en la biomasa, cuando se aplica 0.06 mg O₃/mg Biomasa se recupera en promedio 0.2 mg Lípidos/mg Biomasa (20% m/m). De igual forma, se observa que un mayor flujo de aire incrementa el rendimiento final de lípidos.

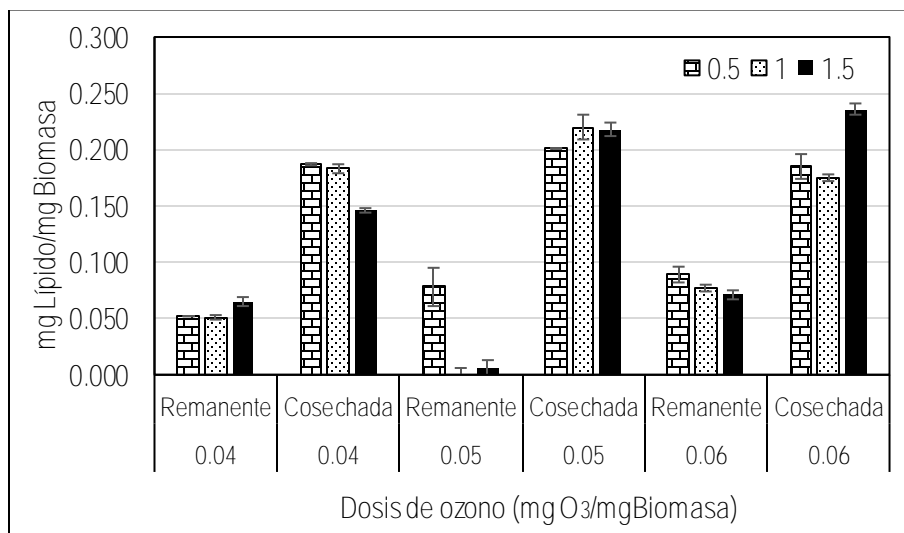


Figura 29 Efecto de la dosis de ozono y el flujo de aire en el rendimiento de lípidos presentes en las microalgas (mg Lípido/mg Biomasa).

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, la Tabla 9 presenta el grado de significancia de los factores probados para el rendimiento de biomasa y lípidos recuperados. Se tomó un nivel de significancia del 95%. Se encontró que el porcentaje de recuperación de la biomasa (SST) se ve afectado por tres efectos importantes, en el siguiente orden: dosis de ozono (A), flujo de aire (B), y la interacción respectiva (AA). De igual forma, se obtuvo de la gráfica de Pareto (resultado no presentado) que estos tres factores con importancia experimental favorecen la recuperación de la biomasa.

Del mismo modo, se encontró que la dosis de ozono (A) y las interacciones AA y AB tiene un efecto significativo en la recuperación de lípidos (valor de $p < 0.05$). De acuerdo con los diagramas de Pareto (resultados no mostrados), la interacción AB y la dosis de ozono favorece el contenido final de los lípidos en la biomasa, al contrario, la interacción AA decrece la recuperación de lípidos.

Tabla 9 Importancia experimental de los factores probados: Dosis de ozono y flujo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa y mg Lípidos/mg Biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.

Factores	Biomasa (%)		mg Lípidos/mg Biomasa	
	F-Ratio	P-Value	F-Ratio	P-Value
A: Dosis de ozono	311.55	0.0000	16.00	0.0008
B: Flujo de aire	89.90	0.0000	1.84	0.1912
AA	15.12	0.0010	23.06	0.0001
AB	2.67	0.4364	32.46	0.0000
BB	0.63	0.8981	0.28	0.6013

Para observar el comportamiento de los factores evaluados, se obtuvo una gráfica de superficie de repuesta en la cual se puede observar, el efecto del incremento de la dosis de ozono en la recuperación de los lípidos. De igual forma, se observa el efecto de la interacción AB para la recuperación de lípidos, esto a través de la relación directa entre el incremento de la dosis de ozono y el flujo de aire en el contenido lipídico final de la biomasa microalgal. De acuerdo a la gráfica de superficie de respuesta, Figura 30, se obtuvo una condición óptima de estos factores de proceso para la recuperación de lípidos, las cuales son: dosis de ozono de 0.06 mg O₃/mg Biomasa y un flujo de aire de 1.5 L/min. Mediante estas condiciones se predijo un contenido final de lípidos de 0.23 mg Lípidos/mg Biomasa. Lo cual representaría 2.3 veces más que el inicial.

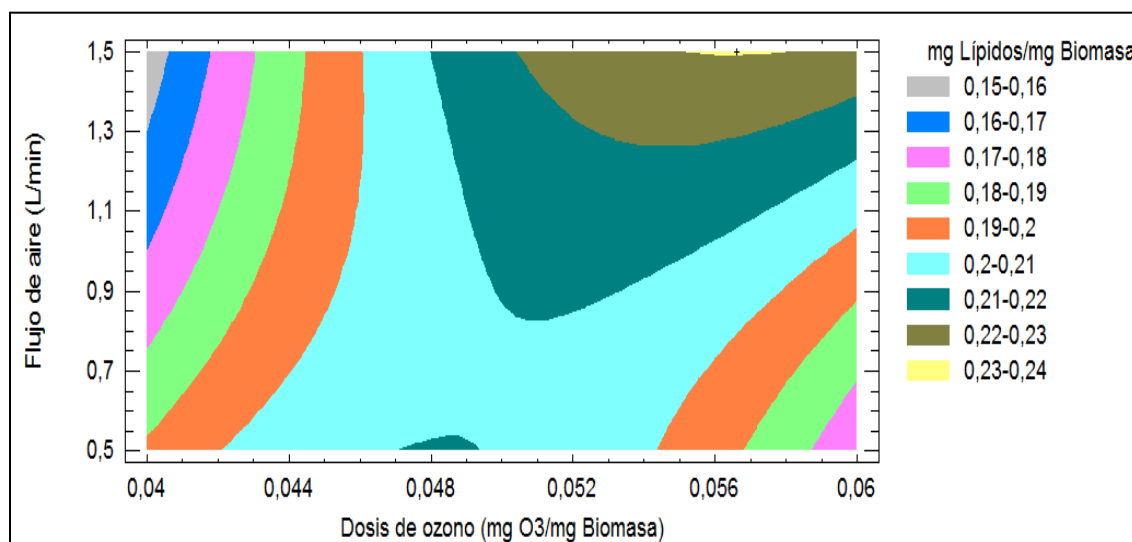


Figura 30 Gráfica de superficie de respuesta para el rendimiento de lípidos (mg Lípidos/mg Biomasa) durante el cosechado por flotación ozono-aire

6.3.2 Efecto del flujo y tiempo de aplicación de aire en el proceso de cosechado

Durante esta fase de experimentación, se deseaba incrementar los resultados anteriormente obtenidos de rendimiento de biomasa. Para llevar a cabo la experimentación se tomó en cuenta la mejor condición de dosis de ozono obtenida previamente de 0.06 mg O₃/mg Biomasa y se vario el flujo y tiempo de flotación con aire.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación, la Figura 31, muestra la recuperación de la biomasa en función de los factores probados. La recuperación de la biomasa se vio beneficiada por el incremento del flujo de aire y por el menor tiempo de flotación con aire (2 min). Sin embargo, durante la experimentación se observó que el incremento del flujo de aire producía un incremento en el volumen final del recuperado y por lo tanto una disminución en la concentración final de la biomasa disponible al final del proceso de cosechado. Esto debido a que el incremento en el flujo del aire redujo el drenado del agua presente en la espuma formada.

Con la modificación de los factores probados se obtuvo una máxima recuperación de biomasa del 60%. Esta recuperación fue superior a la obtenida en la fase anterior de experimentación. Sin embargo, cuando se evaluaron estos factores en función del contenido lipídico, se observó que un mayor tiempo de flotación con aire (4 min) favoreció la recuperación de lípidos (0.24 mg Lípidos/mg Biomasa), Figura 32. La menor recuperación (0.08 mg Lípidos/mg Biomasa) se presentó con un tiempo de flotación de 2 min.

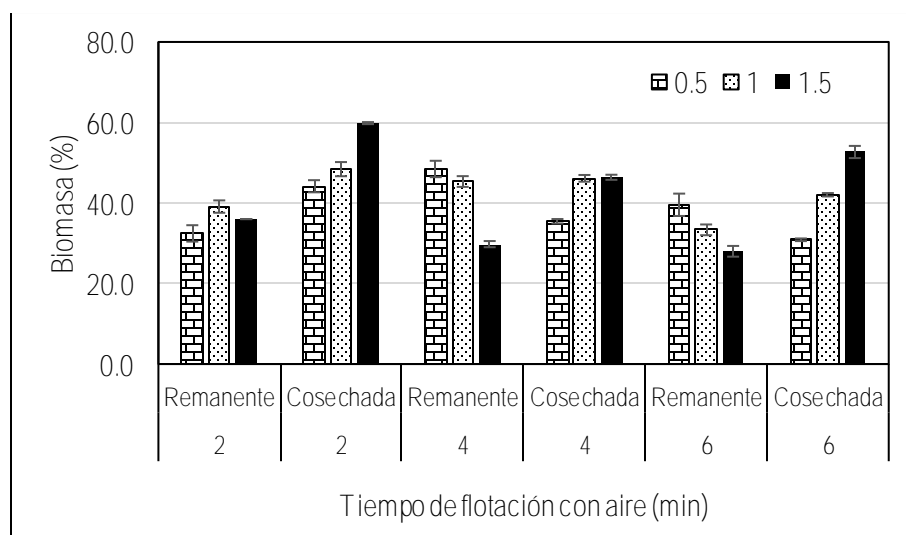


Figura 31 Efecto del flujo y tiempo de la flotación con aire en la recuperación de Biomasa.

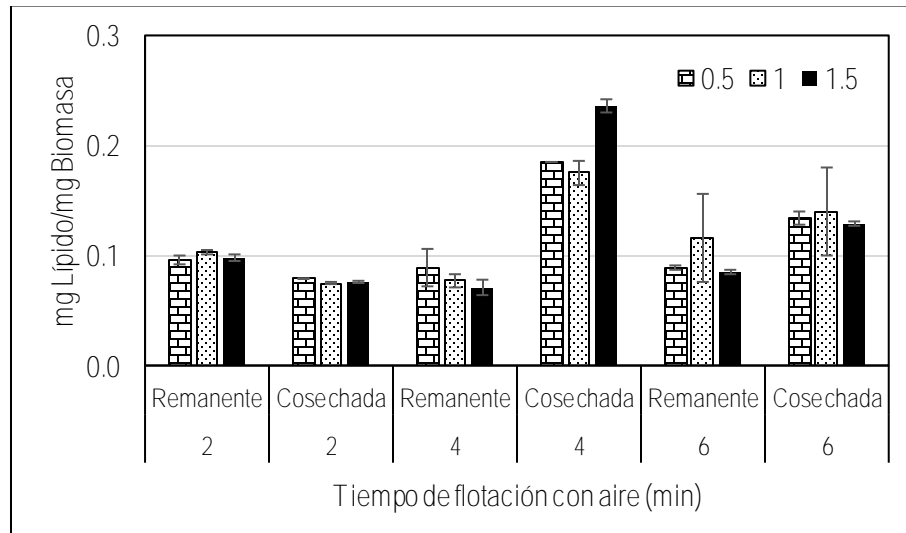


Figura 32 Efecto del flujo y tiempo de aire en el rendimiento de lípidos presentes en las microalgas (mg Lípido/mg Biomasa).

De igual forma se realizó un análisis estadístico para obtener las principales importancias experimentales, se estableció un nivel de significancia del 95%, Tabla 10. Se encontró que el porcentaje de recuperación de la biomasa (SST) se ve afectado por tres efectos importantes, en el siguiente orden: flujo de aire (A), con un p-value de 0.0000, tiempo de aire (B), con un p-value de 0.0000; y finalmente, la interacción BB, con un p-value de 0.0143. Por otra parte, de acuerdo a la gráfica de Pareto (resultado no presentado) se obtuvo que flujo de aire y la interacción BB favorecen la recuperación de la biomasa, caso contrario el incremento en el tiempo de aire afecta la recuperación de la biomasa.

Del mismo modo, se encontró que el tiempo de aire (B) y la interacción BB tiene un efecto significativo en la recuperación de lípidos (valor de $p < 0.05$). De acuerdo con el diagrama de Pareto (resultados no mostrados), se obtuvo que el tiempo de aire favorece la recuperación de lípidos. Igualmente, se obtuvo la gráfica de superficie para la recuperación de lípidos al final del proceso, Figura 33. A partir de la superficie de respuesta se observa claramente que el tiempo alrededor de 4 min favorece el contenido final de lípidos.

Tabla 10 Importancia experimental de los factores probados: Flujo y tiempo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa y mg Lípidos/mg Biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.

Factores	Biomasa (%)		mg Lípidos/mg Biomasa	
	F-Ratio	P-Value	F-Ratio	P-Value
A: Flujo de aire	98.69	0.0000	3.35	0.0827
B: Tiempo de aire	32.32	0.0000	51.09	0.0000
AA	0.01	0.9129	1.98	0.1755
AB	3.95	0.0614	0.01	0.9073
BB	7.27	0.0143	176.53	0.0000

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos se obtuvo que las condiciones óptimas para aumentar el rendimiento de la biomasa cosechada, son: un flujo de aire de 1.5 L/min y un tiempo de aire de 2 min. Y para la recuperación de lípidos, son: flujo de 1.5 L/min y un tiempo de aireación de 4.3 min. Se tomó la decisión de favorecer la recuperación de lípidos, por lo que para experimentos posteriores se utilizara un tiempo de aireación constante de 4 min, ya que este trabajo de investigación está enfocado en la recuperación de la biomasa, pero con la condición de tener un alto contenido de lípidos para la potencial producción de biodiesel.

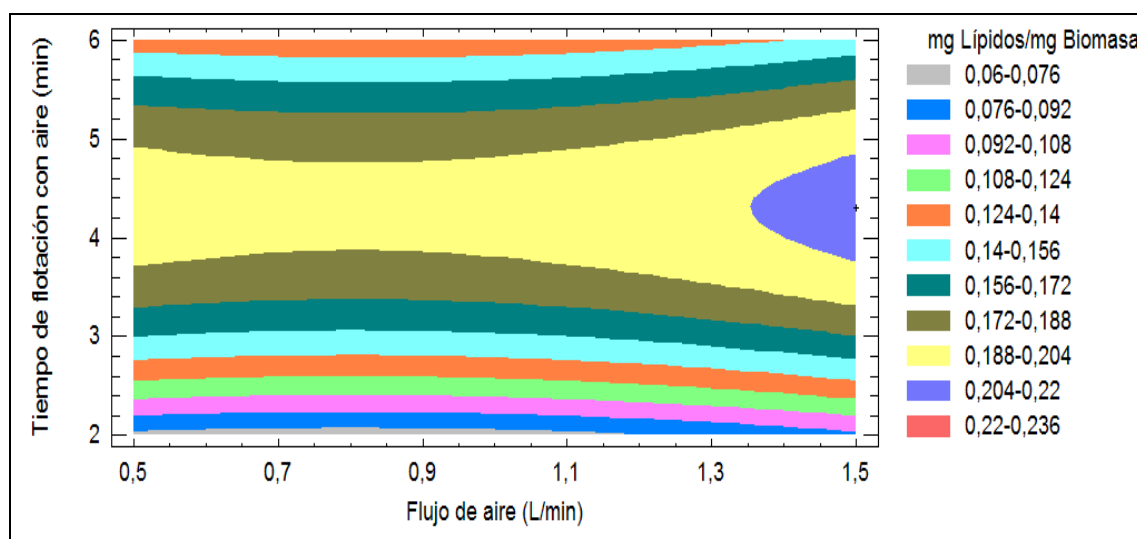


Figura 33 Grafica de superficie de respuesta para la recuperación de Lípidos en función del tiempo y flujo de la flotación con aire.

6.3.2 Efecto de la dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire en el proceso de cosechado

Con base a los resultados obtenidos previamente, se obtuvo el cosechado del 50-60% de la biomasa inicial. Sin embargo, dentro de esta investigación se deseaba mejorar aun más el rendimiento de biomasa recuperada, es por ello que se modificaron las variables de operación tomando en cuenta dosis de ozono superiores a las probadas, debido que el uso del ozono como pretratamiento fuera una limitante en el proceso de cosechado por flotación ozono-aire. Para ello fue necesario modificar la concentración de ozono en el gas de entrada, debido a que, al utilizar mayores dosis de ozono y concentraciones altas de ozono en el gas de entrada, los tiempos de pretratamiento con ozono se ven disminuidos (Ec. 2 y 3). De igual forma, se decidió evaluar el flujo de aire, debido a que previamente se observó su efecto en el rendimiento de la recuperación de lípidos, y durante esta fase de experimentación además de evaluar lípidos se evaluarán otras macromoléculas de interés (carbohidratos (CHO's) y proteínas, sección 6.4), por lo que se creyó podría ser un factor importante a evaluar.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 34, donde se puede apreciar que el incremento en la dosis de ozono, favoreció el cosechado de la biomasa. Se obtuvieron máximos rendimientos de recuperación de biomasa del 100%. Lo cual se atribuye al incremento del periodo de pretratamiento con ozono y sus efectos en la generación de tensoactivo proteínico, ya que durante esta experimentación el tiempo de flujo de aire se mantuvo fijo a 4 min de operación. Sin embargo, la combinación de los factores dosis de ozono y flujo de aire produjeron altos rendimientos de recuperación. Para todas las condiciones probadas de experimentación la concentración de ozono gas de 18 mg O₃/L arrojó la mayor cantidad de biomasa cosechada.

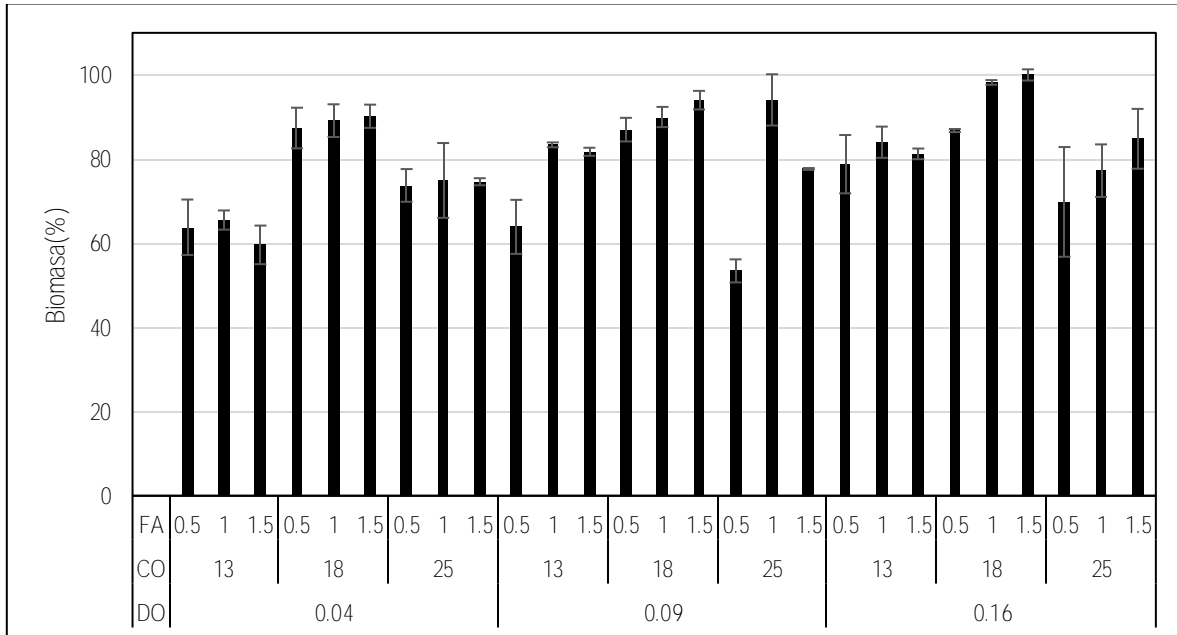


Figura 34 Rendimiento de Biomasa cosechada por efecto los factores evaluados, FA: Flujo de aire (L/min), CO₃ entrada: Concentración de ozono (mg O₃/L) y DO: Dosis de ozono (mg O₃/mg Biomasa).

Lo anteriormente descrito, se apoyó en el análisis estadístico de los resultados obtenidos, Tabla 11. Se encontraron cuatro factores experimentales con importancia estadística en un nivel de significancia de 95%. El cosechado de la biomasa se ve afectado por las interacciones BB (p-value, 0.0000) y AC (p-value, 0.0002), y los factores principales: flujo de aire (p-value, 0.0011) y la dosis de ozono (p-value, 0.0352). De acuerdo a la gráfica de Pareto (no mostrada), el cosechado de la biomasa solo se ve afectada por la interacción BB; y los factores principales favorecen la recuperación de la biomasa.

Tabla 11 Importancia experimental de los factores probados: Dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.

Factor	F-Ratio	P-Value
A: Dosis de ozono	4.73	0.0352
B: Concentración de ozono	0.05	0.8184
C: Flujo de aire	12.15	0.0011
AA	1.50	0.2269
AB	1.75	0.1926
AC	16.94	0.0002
BB	64.04	0.0000
BC	3.46	0.0698
CC	2.59	0.1151

De igual forma se obtuvo un modelo de superficie de respuesta, Figura 35, en el cual se observa el efecto de la dosis y la concentración de ozono. El flujo se ha mantenido constante a 1.5 L/min, debido a que es la condición de experimentación que produce mayor recuperación de biomasa. A partir del modelo de superficie de respuesta, se obtuvo que una recuperación de biomasa del 100%, se obtendría a una dosis de ozono de 0.16 mg O₃/mg Biomasa, concentración de ozono 19.1 mg/L y un flujo de aire de 1.5 L/min. La biomasa de *Scenedesmus sp.* utilizada para llevar a cabo las pruebas de cosechado por flotación ozono-aire tenía un rendimiento inicial de lípidos del 0.1079 ± 0.0345 mg Lípidos/mg Biomasa. Sin embargo, la condición óptima produjo un rendimiento lipídico de 0.0782 ± 0.00782 mg Lípidos/mg Biomasa. Lo cual estaría indicando la oxidación de los lípidos presentes en la biomasa.

Por otra parte, la condición de óptima de cosechado, obtuvo una concentración promedio de biomasa cosechada de 21 g/L ± 5.0 (2.1% sólidos en el recuperado), lo que representa una concentración de la biomasa de 28 veces con respecto a la concentración inicial. Es importante mencionar que el recuperado final tenía un volumen de 15 mL. Cabe resaltar que se hicieron pruebas de sedimentación para la biomasa cosechada por flotación ozono-aire, obteniéndose como resultado que el lodo formado presentaba una concentración final 48 g/L de biomasa, lo que representaba la concentración de la biomasa inicial en 64 veces. El proceso sedimentación posterior a la flotación ozono-aire se ve favorecida debido a que la biomasa se encuentra desestabilizada y a las biomoléculas liberadas al medio acuoso podría estar actuando como coagulante.

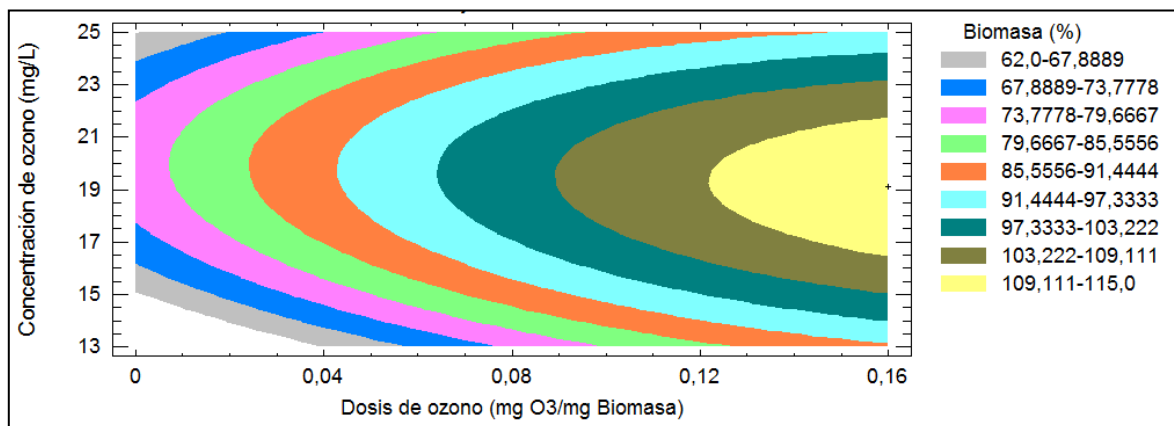


Figura 35 Modelo de superficie de respuesta obtenido para el cosechado de biomasa en función a la dosis de ozono y la concentración de ozono, el modelo presentado mantiene el flujo de aire constante a 1.5 L/min.

Los mejores resultados de cosechado de biomasa por flotación ozono -aire fueron comparados con ozono flotación convencional, para ambos procesos de flotación se obtuvieron rendimiento de cosechado superiores al 95% de la biomasa presente, sin embargo, la ozono flotación requirio una dosis de ozono de 0.22 ± 0.04 mg O_3 /mg Biomasa, comparado con la dosis de 0.16 mg O_3 /mg Biomasa utilizada durante el proceso de flotación ozono-aire. Lo cual representa que el uso de la flotación con ozono-aire reduce en un 35% la dosis de ozono para alcanzar el mismo rendimiento de biomasa cosechada.

Cabe mencionar que durante el proceso de flotación con ozono y flotación ozono-aire se obtuvo una eficiencia de transferencia del ozono del 75-80 %.

6.4 Efecto de la flotación ozono-aire en el rendimiento de lípidos, carbohidratos, proteínas y perfil lipídico de las microalgas.

6.4.1 Efecto del proceso de flotación ozono-aire en el rendimiento de lípidos, carbohidratos y proteínas

El proceso de flotación ozono-aire además de ser evaluado en función al rendimiento de biomasa cosechada, fue evaluado en función del rendimiento final de las macromoléculas presentes en las microalgas, se evaluaron lípidos (mg Lípidos/mg Biomasa), carbohidratos (mg CHO's/mg Biomasa) y proteínas totales (mg Proteínas/mg Biomasa) presentes en la biomasa final cosechada.

Las tres macromoléculas antes mencionadas fueron evaluadas de acuerdo a los factores de operación de dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire. La Figura 36, muestra los resultados obtenidos para el contenido final de lípidos, carbohidratos y proteínas en la biomasa cosechada. Es importante mencionar, que *Scenedesmus sp.* cultivada en agua residual, presentaba una composición bioquímica inicial de 0.1079 ± 0.0345 mg Lípidos/mg Biomasa, 0.1889 ± 0.0359 mg CHO's/mg Biomasa y 0.3797 ± 0.0848 mg PT/mg Biomasa.

Durante el proceso de cosechado la composición bioquímica de la microalga se vio modificada. El rendimiento de lípidos solo se mejoró cuando se utilizaron concentraciones de ozono altas (18 y 25 mg/L), se alcanzó un máximo rendimiento de 0.2 mg Lípidos/mg Biomasa, bajo las siguientes condiciones: 0.16 mg O₃/mg Biomasa, 25 mg O₃/L y 1.5 L aire/min. La evaluación de los lípidos en el medio acuoso del recuperado presentaba una concentración de 28 ± 3.76 mg/L. Cuando se utilizó una concentración de ozono de 13 mg O₃/L, el rendimiento de lípidos obtenido fue inferior al contenido inicial. Lo cual puede estar atribuido a que existe una oxidación por efecto del ozono con los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las microalgas (10-70% del total de ácidos grasos) (Kumari, et al., 2013). La oxidación con ozono de los ácidos grasos presentes en las microalgas, está asociado a la reacción con las estructuras insaturadas, ya que estas incrementan en función al contenido de dobles enlaces dentro de la cadena de carbono.

Por su parte, durante el proceso de cosechado el rendimiento de carbohidratos en la biomasa cosechada ha sido el más afectado. Ya que, solo una condición de las probadas logró recuperar la cantidad inicial de carbohidratos (0.09 mg O₃/mg Biomasa, 25 mg O₃/L y 0.5 L aire/min), las restantes condiciones probadas solo recuperaron aproximadamente del 50% de los carbohidratos iniciales. Dicho efecto puede estar atribuido a la ubicación de los carbohidratos en las células de la microalga; los carbohidratos son componente principal de la pared celular de la microalga (Chen, et al., 2013). Una vez eliminado el recubrimiento de la microalga, el ozono entra en contacto con la pared celular, por lo que se podría presentar una reacción entre el ozono y los carbohidratos, disminuyendo así el rendimiento de recuperación. Sin embargo, se ha reportado que, debido a la estructura química de los carbohidratos, estos tiende a ser poco reactivos con el ozono (Langlais, et al., 1991), por lo que no se podría estar llevando a cabo la oxidación de estos, sino su liberación al medio acuoso.

Debido a lo anterior, se evaluó la concentración de carbohidratos en el medio acuoso del recuperado. Donde se observó que el recuperado presentaba altas concentraciones de carbohidratos, por lo que se pudo concluir que durante del cosechado de microalgas por flotación con ozono-aire, los carbohidratos se liberar al medio acuoso y además son cosechados en el concentrado final de biomasa. El cosechado presentaba una concentración final de carbohidratos de 224.55 ± 11.69 mg/L, comparado con la concentración inicial de carbohidratos en el cultivo inicial de 76 ± 9 mg/L. Es preciso mencionar, que de igual forma se evaluó la concentración de los carbohidratos en el remanente en la columna, obteniéndose una concentración de 13.02 ± 1.63 mg/L.

Al igual que los lípidos, las altas concentraciones de ozono (25 mg O_3/L) favorecieron el rendimiento final de proteínas en la biomasa cosechada, en referencia a la inicial. En la biomasa cosechada se alcanzó un rendimiento máximo de 0.43 mg PT/mgBiomasa. El cosechado final de biomasa presentaba una concentración final de proteínas de 1.7 ± 0.56 g/L.

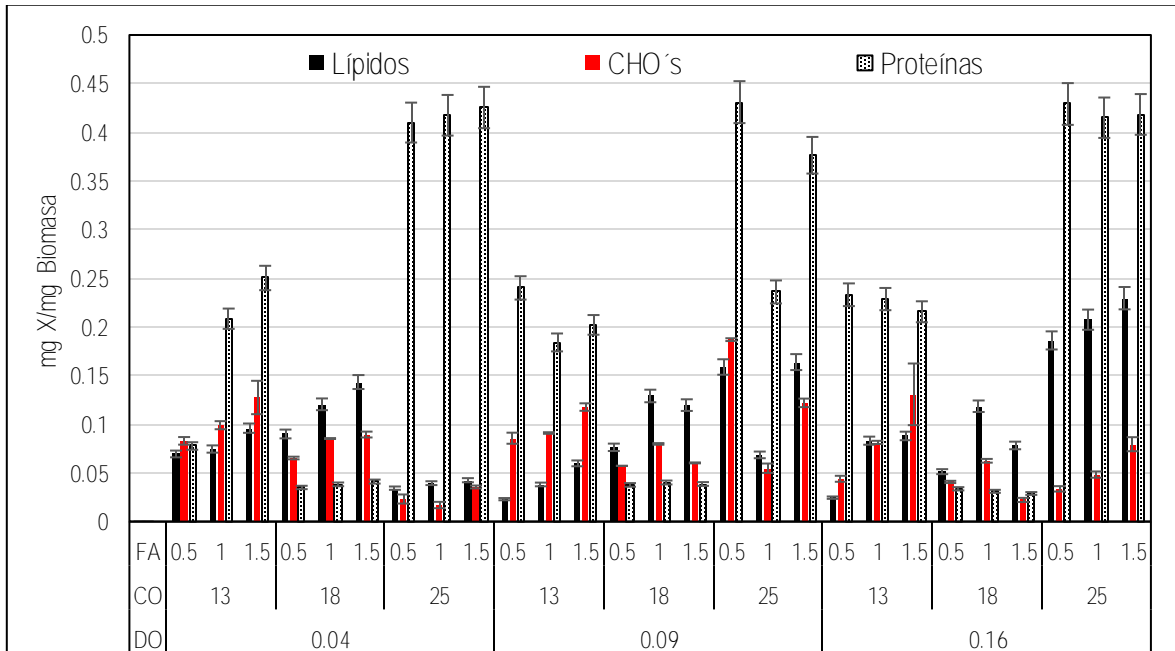


Figura 36 Rendimiento de mg X/mg Biomasa (X: lípidos, CHO's y Proteínas) en la biomasa cosechada por efecto los factores evaluados, FA: Flujo de aire (L/min), CO₂ Entrada: Concentración de ozono (mg O₃/L) y DO: Dosis de ozono (mg O₃/mg Biomasa).

Como se mencionó, los lípidos y las proteínas se vieron favorecidos por altas concentraciones de ozono y una dosis de ozono de 0.16 mg O₃/mg biomasa, lo cual están directamente ligadas a tiempo, ya que se requiere un menor tiempo de oxidación con una concentración alta de ozono para alcanzar la dosis deseada.

De acuerdo al análisis estadístico se encontró que el rendimiento de lípidos se ve afectado por los factores principales: concentración de ozono (p-value, 0.0008) y flujo de aire (p-value, 0.0444) y la interacción AB. Estos tres factores afectan de manera positiva la recuperación de dicha macromolécula. Por su parte, la recuperación de CHO's se ve afectada por las interacciones AA y BC. Finalmente, la recuperación de las proteínas se ve afectada por la concentración de ozono (p-value, 0.0000) y las interacciones AC y BB.

La Tabla 12, presenta las condiciones óptimas para el proceso de cosechado por flotación ozono-aire, para obtener el mayor de las tres macromoléculas evaluadas. Se puede observar que las condiciones de optimización varían de acuerdo al parámetro que se desea optimizar.

Tabla 12 Importancia experimental de los factores probados: Dosis de ozono, concentración de ozono y flujo de aire para el proceso de flotación ozono-aire, para la recuperación de mg lípidos/mg Biomasa, mg CHO's/mg Biomasa, mg PT/mg Biomasa. Nivel de significancia fue de 95%.

Factor	mg Lípidos/mg Biomasa		mg CHO's/mg Biomasa		mg Proteínas/mg Biomasa	
	F-Ratio	P-Value	F-Ratio	P-Value	F-Ratio	P-Value
A: Dosis de ozono	1.99	0.1659	0.25	0.6188	0.33	0.5675
B: Concentración de ozono	13.00	0.0008	0.91	0.3460	43.94	0.0000
C: Flujo de aire	4.29	0.0444	0.85	0.3615	0.05	0.8282
AA	1.33	0.2557	4.90	0.0323	0.20	0.6537
AB	11.01	0.0018	1.84	0.1816	0.90	0.3479
AC	1.29	0.2627	0.10	0.7578	5.20	0.0276
BB	1.04	0.3131	2.32	0.1348	43.64	0.0000
BC	0.70	0.4060	4.59	0.0379	3.42	0.0712
CC	0.07	0.7979	1.27	0.2651	3.15	0.0829

A partir de los resultados experimentales obtenidos y el modelo superficie realizado para cada de uno de los factores de respuesta planteados, se encontró las condiciones óptimas para obtener el mayor rendimiento de la biomasa y de las macromoléculas, Tabla 13. Es importante mencionar, que dichos modelos se utilizan para predecir los resultados que arrojarían otras condiciones de operación que no fueron trabajadas, sin embargo, las condiciones obtenidas en éste trabajo de investigación se limitan al rango de las condiciones de operación estudiadas.

Tabla 13 Condiciones óptimas del proceso de flotación ozono-aire obtenidas a partir del análisis estadístico, para el rendimiento de biomasa, lípidos, carbohidratos y proteínas

Factores	Biomasa	Lípidos	Carbohidratos	Proteínas
Dosis de ozono	0.16	0.16	0.085	0.16
Concentración de ozono	19.1	25	13	25
Flujo de aire	1.5	1.5	1.5	0.5
Rendimiento estimado	98 %	0.18 mg Lípidos/mg Biomasa	0.14 mg CHO's/mg Biomasa	0.5 mg Proteínas/mg Biomasa

Por otra parte, la Tabla 14 presentan las condiciones de operación y los resultados obtenidos para el proceso de cosechado por flotación con ozono y flotación ozono-aire para el cosechado de microalgas. Cabe recordar que las pruebas de flotación con ozono se realizaron con un consorcio mixto de microalgas. Por su parte, los resultados presentados en la Tabla 14 para la flotación ozono-aire se realizaron con *Scenedesmus obliquus*. Como se puede observar a lo largo de este proyecto se buscó incrementar el porcentaje de recuperación de biomasa microalgal, se alcanzó la recuperación del 100% de la biomasa inicial, sin embargo, la biomasa obtenida presentaba un bajo contenido de macromoléculas. Esto atribuido al tiempo de oxidación aplicado, debido a las condiciones de operación probadas.

A lo largo de la experimentación, durante la evaluación de diferentes condiciones de operación se alcanzó un alto rendimiento de lípidos presentes en la biomasa, sin embargo, la combinación de una alta recuperación de biomasa y de lípidos se alcanzó a altas concentraciones de ozono, la cual promueve la producción de tensoactivos y la desestabilización de la microalgas, sin comprometer el tiempo de oxidación, ya que se probó en este trabajo de investigación que el tiempo de exposición al ozono afecta la recuperación de lípidos.

Tabla 14 Concentrado de resultados obtenidos para el proceso de flotación con ozono y flotación ozono-aire durante el trabajo de investigación.

Condición	Concentración de Biomasa (mg/L)	Dosis de ozono (mg O ₃ /mg Biomasa)	Concentración de Ozono (mg/L)	Tiempo de aireación (min)	Flujo de aireación (L/min)	Biomasa recuperada (%)	Lípidos (mg Lípidos/mg Biomasa)	Carbohidratos (mg CHO's/mg Biomasa)	Proteínas (mg PT/mg Biomasa)
Flotación con ozono	400	0.1361				67	0.05		
Flotación ozono-aire	300	0.027		4	1	57			
	600	0.0234		4	1	68			
	750	0.04		4	1.5	27	0.15		
		0.05		4	1.5	32	0.22		
		0.6		2	1.5	60	0.08		
				4	1.5	46	0.24		
				6	1.5	53	0.13		
		0.16	18	4	1.5	100	0.08	0.02	0.02
0.16	25	4	1.5	85	0.2	0.08	0.41		

6.4.2 Efecto de la flotación ozono-aire en el perfil lipídico final de las microalgas

De igual forma se evaluó el efecto del proceso de cosechado en el perfil lipídico final en las microalgas cosechadas, ya que este trabajo de investigación plantea la utilización de la biomasa microalgal para producción de biodiesel. Dicho efecto se evaluó en condiciones de operación específicas, la primera de ellas nos permitirá recuperar la mayor cantidad de lípidos (25 mg O₃/L, 0.16 mg O₃/mg Biomasa, 1.5 L/min) y la segunda un alto rendimiento de recuperación de biomasa (18 mg O₃/L, 0.16 mg O₃/mg Biomasa, 1.5 L/min). El efecto de la flotación ozono-aire en el perfil lipídico, se comparó con el perfil lipídico de biomasa microalgal cosechada por centrifugación.

En la Tabla 14, se presenta el perfil lipídico obtenido para *Scenedesmus obliquus* cosechada por los métodos probados. De forma general, el ácido palmítico (C16:0) y el linolénico (C18:3), fueron los ácidos extraídos de las microalgas, que presentan mayor abundancia relativa en las muestras obtenidas para los diferentes cosechados, de igual forma se lograron identificar en menor proporción ácido palmitoleico (C16:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido esteárico (C18:0).

También se calculó el porcentaje de ácidos grasos saturados, mono insaturado y poliinsaturados obtenidos, Tabla 14. Se obtuvo que el cosechado por flotación ozono-aire produjo un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados, así mismo produjo un decremento en la cantidad ácidos grasos poliinsaturados, esto en comparación al cosechado por centrifugación. Para poder explicar el efecto del ozono en la composición del perfil lipídico, cabe recordar que dentro de la composición de lípidos en las microalgas existen lípidos neutros o no polares y lípidos polares. Los lípidos neutros (principalmente triglicéridos) son considerados para el almacenamiento de energía en las microalgas y se encuentran ubicados como cuerpos lipídicos en el citoplasma. Por su parte, los lípidos polares (principalmente ácidos grasos poliinsaturados), son utilizados en la estructura membranal de la microalga (Prabandono & Amin, 2015; Hu, et al., 2008).

De acuerdo a la ubicación de los lípidos en las microalgas, el ozono reaccionó primero con los lípidos presentes en la membrana de la microalga, incrementando el grado de saturación de los lípidos polares. Lo anterior se corroboraría con el incremento de los ácidos grasos saturados al final del proceso de flotación por ozono-aire.

A partir de los resultados de flotación por ozono-aire para el perfil lipídico de las microalgas, se puede predecir la obtención de biodiesel con una alta estabilidad oxidativa, es decir, menos propenso a oxidarse durante su almacenamiento. Por ejemplo, el biodiesel obtenido a partir de la condición de flotación ozono-aire que permite la mayor recuperación de lípidos, presentaría una alta estabilidad oxidativa (60% de ácidos saturados y monoinsaturados), en comparación con el obtenido por centrifugación (60% ácidos grasos poliinsaturados).

La aceptabilidad del biodiesel de microalgas depende de la calidad de dicho combustible, la cual está ligada a la composición de los ácidos grasos presentes. La evaluación de la calidad se logra a través de la determinación de sus propiedades físicas y químicas. Las propiedades más relevantes del biodiesel son: el perfil de ácidos grasos, la densidad, la viscosidad, índice de cetano, índice de yodo, estabilidad oxidativa, poder calorífico y contenido de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (Arias-Peñaranda, et al., 2013).

Dichas propiedades se ven afectadas por el grado de insaturación de la cadena de los ésteres alquílicos y de la longitud de ésta. En general los ácidos grasos saturados producen biodiesel con alta estabilidad oxidativa y alto número de cetano, sin embargo, sus propiedades a bajas temperaturas son insuficientes. La longitud del éster alquílico influye en el aumento en el índice de cetano, el poder calorífico y la viscosidad, así mismo estas propiedades disminuyen con el grado de insaturación. Por lo tanto, es preferible un biodiesel con compuestos de cadena larga (C16-C18) y de bajo grado de insaturación (monoinsaturados) (Refaat, 2009; Knothe, 2009; Lapuerta, et al., 2010).

La presencia de ácidos grasos saturados ofrece mayor estabilidad y los ácidos grasos monoinsaturados mejoran las propiedades del biodiesel a bajas temperaturas, por lo que sería factible en cuestión de calidad obtener un combustible con alto contenido de ácidos saturados y monoinsaturados. Por ejemplo, un alto contenido de ácido oleico (C18:1) ofrece un equilibrio entre la estabilidad de oxidación y el punto de taponamiento de filtro en frío del biocombustible; dicho ácido graso se encuentra en alto contenido en la composición de las microalgas (Singh, et al., 2014). En función a lo antes descrito, el método de cosecha de flotación ozono-aire (17.48 % ácidos monoinsaturados) para la recuperación de *Scenedesmus obliquus*, favorecería la calidad final del biodiesel en comparación con la centrifugación (12.40 % ácidos monoinsaturados).

Tabla 15 FAME's de *Scenedesmus obliquus* cosechada por centrifugación y flotación ozono-aire. Las condiciones de flotación ozono-aire se realizaron a 0.16 mg O₃/mg Biomás

FAME	Método de cosecha		
	Centrifugación	Flotación Ozono-aire	
		25 mg O ₃ /L	18 mg O ₃ /L,
C14:0	ND	0.76	0.46
Mirístico			
C15:0	ND	ND	0.48
Pentadecanoico			
C16:0	22.33	35.89	37.66
Palmitico			
C16:1n9c	5.85	9.17	8.00
Palmitoleico			
C16:2	0.62	2.74	ND
7, 10 ácido hexadecadienoico			
C16:3	1.23	2.20	1.34
7, 10, 13 ácido hexadecatrienoico			
C17:0	ND	1.22	ND
Margárico			
C18:0	0.88	2.91	1.59
Esteárico			
C18:1n9c	6.55	1.79	9.19
Oleico			
C18:2n6c	4.10	13.25	10.44
Linoleico			
C18:3n3c	58.43	28.01	27.79
Linolénico			
C22:0	ND	2.05	1.40
Behénico			
Saturados	23.21	42.83	42.29
Mono insaturados	12.40	10.96	17.48
Poliinsaturados	64.39	46.20	40.23
C16-C18	23.21	38.80	39.91

ND: No detectado.

6.4.3 Evaluación de las condiciones de operación de la flotación ozono -aire para el cosechado de *Desmodesmus sp.*

Se ha reportado que el método de cosecha se ve afectado por la cepa de microalga, es por ello que se evaluó el proceso desarrollado en función a otro género microalgal, en este caso *Desmodesmus sp.* A partir de las pruebas realizadas para *Scenedesmus obliquus*, se obtuvieron condiciones de operación para el cosechado por flotación ozono-aire, que permitieron el mayor rendimiento de biomasa y lípidos recuperados, estas condiciones se probaron para la microalga *Desmodesmus sp.*, la cual fue cultivada en agua residual. Se evaluaron dos condiciones de operación: 1°) Mayor rendimiento de recuperación de biomasa (0.16 mg O₃/mg Biomasa, 18 mg O₃/L y 1.5 L aire/min) y 2°) Mayor rendimiento de recuperación de lípidos. (0.16 mg O₃/mg Biomasa, 25 mg O₃/L y 0.5 L aire/min). Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en la Tabla 15, donde se aprecia el rendimiento de biomasa, lípidos, carbohidratos y proteínas cosechadas.

Tabla 16 Comparación entre los resultados experimentales para el cosechado de *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus sp.*

Respuesta	<i>Scenedesmus obliquus</i>			<i>Desmodesmus sp</i>		
	Centrifugación	Ozono-aire		Centrifugación	Ozono-aire	
		1°	2°		1°	2°
% Biomasa	100	100	84	100	9	52
mg Lípidos/mg Biomasa	0.108	0.782	0.230	0.200	0.177	0.256
mg CHO's/mg Biomasa	0.189	0.302	0.800	0.270	0.258	0.357
mg PT/mg Biomasa	0.38	0.288	0.420	0.362	0.301	0.390

Como se puede observar en la tabla anterior, las condiciones de proceso obtenidas para *Scenedesmus obliquus* no produjeron el mismo rendimiento de biomasa cuando se utilizó a *Desmodesmus sp.* Esto puede estar atribuido a que *Desmodesmus sp.* y *Scenedesmus obliquus* presentan una diferencia en la composición de su pared celular, ya que, *Desmodesmus sp.* tiene una capa más de esporopolenina que *Scenedesmus obliquus* (An, et al., 1999). El ozono reacciona con la pared celular de la microalga que está compuesta por esporopolenina; se ha reportado que la esporopolenina es un biopolímero con alta estabilidad física, química y biológica, lo que representaría un mayor consumo de ozono para lograr la lisis de la microalga, y como consecuente la liberación del tensoactivo proteínico para llevar a cabo el cosechado de la biomasa.

Por otra parte, se observó que *Desmodesmus sp.* presentó en general un mayor contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas en comparación a *Scenedesmus sp.* El efecto del método de cosecha, cuando se utilizó la condición para obtener una mayor recuperación de biomasa (1°), no se produjo un cambio significativo en la composición de la biomasa final. La implementación de la segunda condición de flotación produjo un mayor rendimiento de las macromoléculas evaluadas, por lo que se puede considerar que la flotación ozono-

aire actúa como un pre-tratamiento no solo para el cosechado de la biomasa, sino también para la recuperación de los metabolitos de interés.

De igual forma, se evaluó el perfil lipídico final de *Desmosdemus sp.* obtenido por flotación ozono-aire y comparado con la centrifugación, Tabla 16. Es preciso mencionar que el perfil lipídico solo se evaluó a partir de la segunda condición de flotación probada. El cosechado por centrifugación presentó principalmente ácido palmítico (C16:0, 30.16%) y ácido oleico (C18:1, 21.39%). Por su parte, la flotación con ozono-aire, modificó el contenido del ácido oleico, aumentando hasta un 35.84%, de igual forma se incrementó en contenido del ácido palmitoleico (C16:1, 20.12%).

A diferencia de *Scenedesmus obliquus*, el contenido final de FAME mono insaturados en *Desmodesmus sp.* alcanzó un 55.98% del total de lípidos presentes en la microalga. Lo cual representaría una mejor calidad del biocombustible a producir, Biodiesel.

Tabla 17 FAME's obtenidos a partir de *Desmodemus sp.* cosechada por centrifugación y flotación ozono-aire.

FAME	Método de cosecha	
	Centrifugación	Flotación Ozono-aire
		<i>18 mg O₃/L, 0.16 mg O₃/mg Biomasa</i>
C12:0 Laurico	0.22	ND
C13:0 Tridecílico	0.8	ND
C15:0 Pentadecanoico	0.75	0.71
C16:0 Palmítico	30.16	18.46
C16:1n9c Palmitoleico	9.04	20.12
C16:2 7, 10 ácido hexadecadienoico	3.76	4.16
C16:3 7, 10, 13 ácido hexadecatrienoico	ND	1.61
C18:0 Esteárico	10.688	5.85
C18:1n9c Oleico	21.39	35.84
C18:2n6c Linoleico	12.45	11.35
C18:3n3 Linolénico	9.24	ND
C22:0 Behénico	1.69	1.87
Saturados	44.22	26.90
Monoinsaturados	30.37	55.98
Poliinsaturados	25.40	17.13
C16-C18	40.77	24.32

ND: No detectado

6.5 Balance energético para la producción de biodiesel incluyendo la flotación ozono-aire como método de cosecha de microalgas.

En este trabajo de investigación se realizó un ejercicio de balance energético, el cual permite comparar las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus sp.* y el método de cosechado empleado para la producción de biodiesel. Para ello se estableció una meta de producción de 1,000 Ton de biodiesel anuales, el tren de proceso establecido es el siguiente: cultivo (estanque abierto tipo Raceway, mezclado y bombeo), cosecha (centrifugación y flotación ozono-aire), extracción-transesterificación (obtención de biodiesel), acondicionamiento de biomasa (secado a vapor y trituración solo para el cosechado por centrifugación) y la energía producida por el biodiesel y los subproductos (glicerina y biomasa residual).

Se estimó la cantidad de biomasa requerida para obtener una tonelada anual de biodiesel, para cada género de microalga. Lo anterior en función a los resultados experimentales obtenidos de contenido lipídico y de rendimiento de recuperación de biomasa por cada método de cosecha comparado y para las dos condiciones de flotación ozono-aire probadas (1° mayor rendimiento de biomasa y 2° mayor rendimiento de lípidos), Tabla 17.

Tabla 18 Biomasa necesaria para llevar a cabo la producción de una tonelada de biodiesel anual.

	Centrifugación		Flotación ozono-aire (1°)		Flotación ozono-aire (2°)	
	Lípidos (%)	Biomasa (Ton/año)	Lípidos (%)	Biomasa (Ton/año)	Lípidos (%)	Biomasa (Ton/año)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10.79	9,361.46	7.82	12,916.89	22.95	5,239.65
<i>Desmodesmus sp</i>	20	5,050.51	17.74	43,794.36	25.62	7,581.97

La Tabla 18 presentan las energías asociadas y el NER obtenido al proceso de producción de biodiesel a partir de las microalgas, *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus sp*, respectivamente. De acuerdo a la tabla 18, se puede observar que la implementación de la flotación ozono-aire para la producción de biodiesel, tiene como proceso de mayor consumo energético el cultivo de las microalgas, del 54-58% de la energía total consumida. Lo cual se asocia a los rendimientos alcanzados en la concentración de la biomasa producida y al contenido de lípidos presentes en las microalgas. Por otra parte, la flotación con ozono-aire representa del 5-10% de la energía consumida para la producción de biodiesel, esto en función del contenido de lípidos y la concentración inicial de la biomasa microalgal. Se observó que una variable muy importante para el balance de energía es el contenido lipídico final en las microalgas, es por ello que los escenarios para la flotación ozono-aire de *Scenedesmus sp* y *Desmodesmus sp* varían en función de la condición de operación, ya que de esta depende el contenido de lípidos.

Tabla 19 Ejercicio energético para la producción de biodiesel a partir de *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus sp.*

	<i>Scenedesmus obliquus</i>			<i>Desmodesmus sp</i>		
	Flotación ozono-aire		Centrifugación	Flotación ozono-aire		Centrifugación
	1°	2°		1°	2°	
Energía consumida por cada etapa						
Cultivo	1.35E+07	4.99E+06	4.38E+05	5.93E+06	4.56E+06	2.36E+05
Cosecha	3.92E+05	1.59E+05	1.50E+07	1.33E+06	2.29E+05	1.01E+07
E-T	6.84E+05	6.84E+05	6.84E+05	3.19E+05	3.19E+05	3.19E+05
Acondicionamiento	1.73E+06	5.90E+05	1.40E+06	7.63E+05	5.28E+05	7.58E+05
Energía Total Consumida	1.63E+07	6.42E+06	1.75E+07	8.34E+06	5.64E+06	1.14E+07
Energía producida por el biocombustible y los subproductos						
Biodiesel	1.07E+07	1.07E+07	1.07E+07	1.07E+07	1.07E+07	1.07E+07
Glicerina	1.56E+06	1.56E+06	1.56E+06	1.56E+06	1.56E+06	1.56E+06
Biomasa residual	7.23E+04	2.93E+04	5.24E+04	3.19E+04	4.25E+04	2.83E+04
Energía producida	1.23E+07	1.23E+07	1.23E+07	1.23E+07	1.23E+07	1.23E+07
NER	0.76	1.91	0.70	1.47	2.18	1.08

De igual forma, la Tabla 19 presenta los NER obtenidos para cada uno de los procesos evaluados; cabe resaltar que el proceso de producción de biodiesel que utiliza flotación con ozono-aire como método de cosecha, alcanza NER's superiores comparado a cuando se produce el biodiesel a partir de microalgas cosechadas por centrifugación. Dentro de la flotación con ozono-aire, la segunda condición alcanza NER's superiores a uno, lo que implica que se produce mayor energía a la consumida durante el proceso. Estos resultados se atribuyen al alto contenido lipídico alcanzado para esta condición de operación. El mayor NER obtenido fue para *Desmodesmus sp*, bajo la segunda condición de flotación ozono-aire, el cual se incrementaría si se mejoraran las condiciones de operación para el cosechado, ya que solo se alcanzó a recuperar alrededor del 50% de la biomasa presente en el cultivo.

El valor de NER (0.76-2.18) obtenido durante este trabajo, es comparable con lo reportado cuando se utiliza soja como materia prima (NER de 0.61 a 2.41) o cuando se utiliza aceite de palma (NER de 1.64 a 4.7) (Zhang, et al., 2013).

Por otra parte, en el estudio realizado por Nava (2014) de balance energético para la producción de biodiesel a partir de microalgas y utilizando la flotación con ozono como método de cosecha, el autor reportó que la etapa de mayor consumo energético fue el cosechado (mediante flotación con ozono) con un requerimiento del 77% del consumo total de la energía, dicho trabajo presenta límites y biocombustibles a producir diferentes. A diferencia de lo encontrado por Nava (2014), en esta investigación el proceso que mayor gasto energético presentó fue la etapa de cultivo.

De igual forma, Nava (2017) reportó mediante un análisis de sensibilidad realizado para el proceso de flotación con ozono que un valor de NER de 1.18 era alcanzable, bajo las siguientes condiciones de: *Scenedesmus obliquus* con un contenido lipídico del 25 % en la microalga y una dosis de ozono de 0.05 mgO₃/mg Biomasa. Del mismo modo, el autor reportó que el proceso de flotación con ozono para la cosecha de microalgas presentaba un consumo energético de 16.6 MJ/Kg Biodiesel y del 35.5 MJ/Kg Biodiesel para el proceso total de producción de biodiesel.

Comparando los resultados obtenidos por el autor con los alcanzados durante este trabajo de investigación, se encontró que el proceso de flotación con ozono-aire presentaba un consumo energético del 11.10 MJ/Kg Biodiesel y el proceso total de producción de biodiesel es de 30.51 MJ/Kg Biodiesel. Dicha disminución se atribuye al uso de la etapa de flotación con aire, una disminución del 30%.

7 CONCLUSIONES.

Se desarrolló y estableció condiciones de operación para un sistema de cosechado de microalgas a través de la combinación del uso del ozono como pretratamiento y la flotación con aire (flotación ozono-aire) para la producción potencial de biodiesel y de otros productos de alto valor agregado como son: proteínas, lípidos y carbohidratos.

- Se concluye que el ozono tiene como principal función la desestabilización de las microalgas y la liberación de tensoactivo proteínico durante el proceso de ozonoflotación. El ozono modifica el **potencial "z" favoreciendo la interacción entre células de microalgas y la proteína liberada reduce la tensión superficial** permitiendo así la separación de la biomasa microalgal por el fenómeno de flotación.
- Se concluye que es posible cosechar microalgas cultivadas en agua residual aplicando ozono como pretratamiento, bajo condiciones controladas de dosis y tiempo, lo que permite inducir la separación de las microalgas mediante flotación con aire disperso.
- A partir de la optimación del proceso de cosechado se encontró que las principales variables que afectan el proceso de flotación ozono-aire son: la dosis de ozono, la concentración de ozono y el flujo de aire.
- Con respecto a las condiciones óptimas de operación del sistema de cosechado, se concluye que no fue posible establecer una condición única que permitiera obtener los mayores rendimientos de biomasa y recuperación de productos valorizables (lípidos, proteínas y carbohidratos) respectivamente; para cada caso se determinó una condición favorable.
- El cosechado con ozono-aire, favorece la extracción y modifica el perfil de lípidos de las microalgas cosechadas; se encontró que hay un incremento de los ácidos grasos saturados, lo que representaría una mayor estabilidad oxidativa del biodiesel producido.
- A partir de la evaluación energética, donde se consideró la producción de biodiesel utilizando diversos escenarios en función al método de cosecha, se obtuvo que el cosechado de la biomasa presentaba un 5-10% del consumo total de energía, mientras que el cultivo de la biomasa es la etapa que consume mayor gasto energético dentro del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas.

8 REFERENCIAS.

Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C.; Lim, J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (2011) 584-593.

Alves Oliveira, Gislayne; Carissimi, Elms; Monje-Ramirez, Ignacio; Velasquez-Orta, Sharon B.; Teixeira, Rafael; Orta Ledesma, Maria Teresa. Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in high-rate algal pond. *Bioresource Technology*, 259 (2018) 334-342.

Aminul Islam, Muhammad; Heimann, Kirsten; Brown, Richard J. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79 (2017) 1160-1170.

An, S.S.; Friedl, T.; Hegewald, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like Coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biol.*, 1 (2008) 418-428.

APHA-AWWA-WPCF. *Metodos normalizados para el analisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: Diaz de Santos (1992).

Arias-Peñaranda, Martha T.; Cristiani-Urbina, Eliseo; Montes-Horcasitas, Carmen; Esparza-García, Fernando; Torzillo, Giuseppe; Cañizares-Villanueva, Rosa Olivia. *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. *Bioresource Technology*, 140 (2013) 158-164.

Barros, Ana I.; Goncalves, Ana L.; Simoes, Manuel; Pires, José CM. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41 (2015) 1489-1500.

Behrens, P. W. Photobioreactors and Fermentors: The light and dark sides of growing algae. In: *Algal Culturing Techniques*. San Diego California, USA: Elsevier Inc., (2005) 189-204.

Benoufella, N.; Laplanche, A.; Boisdon, V.; Bourbigot, MM. Elimination of *Microcystis* cyanobacteria (blue-green algae) by an ozoflotation process: A pilot plant study. *Water Science Technology* 30 (1994) 245-257.

Betzer, N.; Argaman, Y.; Kott, Y. Effluent treatment and algae recovery by ozone induced flotation. *Water Research*, 14 (1980) 1003-1009.

Birdsall, CM.; Jenkins, AC; Spadinger, Edward. Iodometric determination of ozone. *Analytical Chemistry*, 24 (1952). 662-664.

Bonifacic, Marija; Stefanic, Igor; Hug, Gordon L.; Armstrong, David A.; Asmus, Klaus-Dieter. Glycine Decarboxylation: The Free radical mechanism. *Journal of The American Chemical Society*, 120 (1998) 9930-9940.

Bourbigot, M.; Faivre, M. *Dispositif de Transfert de Gaz et Flottation dans le traitement d'Eau à Epurer*. Paris, Patent No. 86.08780 (1986).

Brennan, Liam; Owende, Philip. Biofuels from microalgae-Areview of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2010) 557-577.

Byreddy, Avinesh R.; Gupta, Andarsha; Barrow, Colin J.; Puri, Munish. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 125 (2016) 28-32.

Cai, Ting; Park, Stephen Y.; Li, Yebo. Nutrient recovery from wastewater streams by microlage: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19 (2013) 360-369.

Caporgno, M.P.; Taleb, A.; Olkiewicz, M.; Font, J.; Pruvost, J.; Legrand, J.; Bengoa, C. Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*, 10 (2015) 232-239.

Cardena, R.; Moreno, G.; Bayonki, P.; Buitrón, G. Enhancement of methane production from various microalgae cultures via novel ozonation pretreatment. *Chemical Engineering Journal*, 307 (2017) 948-954.

Cataldo, Franco. On the action of ozone on proteins. *Polymer Degradation and Stability*, 82 (2003) 105-114.

Chaiklahan, Ratana; Chirasuwan, Nattayaporn; Loha, Veera; Tia, Suvit; Bunnang, Boosya. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresour Technology*, 102 (2011) 7159-7164.

Chen, Chun-Yen; Yeh, Kuei-Ling; Aisyah, Rifka; Lee, Duu-Jong; Chang, Jo-Shu. Cultivation, photobioreactor desing and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technology*, 102 (2011) 71-81.

Chen, Chun-Yen; Zhao, Xin-Qing; Yen, Hong-Wei; Ho, Shih-Hsin; Cheng, Chieh-Lun; Lee, Duu-Jong; Bai, Feng-Wu; Chang, Jo-Shu. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Eginering Journal*, 78 (2013) 1-10.

Cheng, Ya-Ling; Juang, Yu-Chuan; Liao, Guan-Yu; Ho, Shih-Hsin; Yeh, Kuei-Ling; Chen, Chun-Yen; Chang, Jo-Shu; Liu, Jhy-Cherm; Lee, Jhy-Cherm. Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technology*, 101 (2010) 9092-9096.

Cheng, Ya-Ling; Juang, Yu-Chuan; Liao, Guan-Yu; Tsai, Pei-Wen; Ho, Shih-Hsin; Yeh, Kuei-Ling; Chen, Chun-Yen; Chang, Jo-Shu; Liu, Jhy-Chern; Chen, Wen-Ming; Lee, Duu-Jong. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotataion. *Bioresour Technology*, 102 (2011) 82-87.

Chisti, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25 (2007) 291-306.

Cho, Sunja; Lee, Nakyeong; Park, Seonghwan; Yu, Jaecheul; Loung, Thao Thanh; Oh, You-Kwan; Lee, Taeho. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresour technology*, 131 (2013) 1-32.

Cho, Sunja; Loung, Thanh Thao; Lee, Dukhaeng; Oh, You-Kwan; Lee, Taeho. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102 (2011) 8639-8645.

Christenson, Logan; Sims, Ronald. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 686-702.

Chronakis, Ioannis S.; Galanatu, Anca Nicoleta; Nylander, Tommy; Lindman, Bjorn. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina plantesis* strain Pacifica) at the air/water interface. *Colloids and Surface, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 173 (2000) 181-192.

Collet, Pierre; Spinelli, Daniele; Lardon, Laurent; Hélias, Arnaud; Steyer, Jean-Philippe; Bernard, Olivier. Life-cycle assessment of microalgal-based biofuels. *Biofuels from algae*, (2014) p.p. 287-312.

Coward, Thea; Lee, Jonathan G.M.; Caldwell, Gary S. Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass. *Algal Research*, 2 (2013) 135-144.

Cunha, H.N.; Silva, F.L.A.J.; Melo, J.; Cavalcanti, E.H.S.; Fonseca, T.M.; Melcher, E.U.K.; Lima, A.M.N.; Laborde, H.M.; Neff, H. The interaction of ozone with bio-fuel, revealed by electrical conduction and infrared spectroscopy I, revealed by electrical conduction and infrared spectroscopy. *Fuel processing technology*, 92 (2011) 2160-2168.

Debono, O.; Thévenet, F.; Gravejat, P.; Héquet, V.; Raillard, C.; Le Coq, L.; Locoge, N. Gas phase photocatalytic oxidation of decane at ppb levels: Removal kinetics, reaction intermediates and carbon mass balance. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 258 (2013) 17-29.

Duarte Murillo, G. *Balance Energético y Ecológico de la Producción de Biodiesel a partir de Jatropha curcas*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México (2010).

Dubois, Michael; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (1956) 350-356.

Dutta, Kasturi; Daverey, Achlesh; Lin, Jih-Gaw. Evolution retrospective for alternative fuels: Firts to fourth generaion. *Renewable Energy*, 69 (2014) 114-122.

El-Fatah Abomohra, Abd; Jin, Wenbiao; Tu, Renjie; Han, Song-Fang; Eid, Mohammed; Elade, Hamed. Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64 (2016) 596-606.

Fazal, M.A.; Haseeb, A.S.M.A; Masjuki, H.H. Biodiesel feasibility study: An evaluation of material compability, preformance, emission and engine durability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (2011) 1314-1324.

Foegeding, E. Allen; Luck, P.J.; Davis, J.P. Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20 (2006) 284-292.

Gerardo, Michael L.; Van Den Henden, Sofie; Vervaeren, Han; Coward, Thea; Skill, Stephen C. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, 11 (2015) 248-262.

Germain, Juan C.; Aguilera, José M. Multi-scale properties of protein-stabilized foams. *Food structure*, 1 (2014) 55-70.

Gregory, John. *Particles in Water. Properties and Processes*. London, UK: Taylor & Francis Group. (2006).

Guldhe, Abhishek; Ansari, Faiz A.; Singh, Poonam; Bux, Faizal. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99 (2017) 47-53.

Gunerken, E.; D'Hondt, E.; Eppink, M.H.M.; Garcia-Gonzalez, L.; Elst, K.; Wijffels, R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology advances*, 33 (2015) 243-260.

Hadjoudja, S.; Deluchat, V.; Baudu, M. Cell surface characterisation of *Mycrocystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *Journal colloid and Interface Science*, 342 (2010) 293-299.

Halim, Ronald; Danquah, Michael K.; Webley, Paul. A. Extraction of oil microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 709-732.

Halim, Ronald; Gladman, Brenda; Danquah, Michael K.; Webley, Paul A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 178-185.

Hanotu, James; Hemaka Bandulasena, HC; Zimmerman, William B. Microflotation performance for algal separation. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (2012) 1663-1673.

Harkins, William D.; Jordan, Hubert F. A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *Journal American Chemical Society*, 52 (1930) 1751-1772.

Henderson, Rita K.; Parsons, Simon A.; Jefferson, Bruce. The potential for using bubble modification chemicals in dissolved air flotation for algae removal. *Separation science and technology*, 44 (2009) 1923-1940.

Henderson, Rita; Parsons, Simon A.; Jefferson, Bruce. The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Research*, 44 (2010) 3617-3624.

Henderson, Rita; Parsons, Simon A.; Jefferson, Bruce. The impact of algal properties and pre oxidation on solid-liquid separation of algae. *Water Research*, 42 (2008) 1827-1845.

Henderson, R.K.; Parsons, S.A.; Jefferson, B. Successful removal of algae through the control of zeta potential. *Separation Science and Technology*, 43 (2008) 1653-1666.

Hernández García, Andrea. Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua residual y lixiviado. *Tesis Maestría UNAM* (2017).

Hodges, Alan; Fica, Zazhary; Wanlass, Jordan; VanDarlin, Jessica; Sims, Ronald. Nutrient and suspended solids removal from petrochemical wastewater via microalgal biofilm cultivation. *Chemosphere*, 174 (2017) 46-48.

Horiuchi, Jun-Ichi; Ohba, Ichigaku; Tada, Kiyoshi; Kobayashi, Masayoshi; Kanno, Tohru; Kishimoto, Michimasa. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. *Bioscience and Bioengineering*, 95 (2003) 412-415.

Hu, Qiang; Sommerfeld, Milton; Jarvis, Eric; Posewitz, Matthew; Seibert, Michael; Darzins, Al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54 (2008) 621-639.

Jekel, Martin R. The benefits of ozone treatment prior to flocculation processes. *Ozone Science and Engineering*, 5 (1983) 21-35.

Jekel, Martin R. Flocculation effects of ozone. *Ozone Science and Engineering*, 16 (1994) 55-66.

Ji, Fang; Liu, Ying; Hao, Rui; Li, Gang; Zhou, Yuguang.; Dong, Renjie. Biomass production and nutrients removal by new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*, 161 (2014) 200-207.

Jorquera, Orlando; Kiperstok, Asher; Sales, Emerson A.; Embirucu, Marcelo; Ghirardi, Maria L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101 (2010) 1406-1413.

Kadesch, Richar G. Ozonolysis of fatty acids and their derivatives. *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, 6 (1963) 291-312.

Karmakar, Aninidita; Karmakar, Subrata; Mukherjee, Souti. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101 (2010) 7201-7210.

Knight, Joseph A.; Anderson, Shauna; Rawle, James M. Chemical basis of the Sulfo-phospho-vanillin, Reaction for estimating total serum lipids. *Clinical chemistry*, 18 (1972) 199-202.

Knothe, Gerhard. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy and Environmental Science*, 7 (2009) 759-766.

Knothe, Gerhard; Razon, Luis F. Biodiesel fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 58 (2017) 36-59.

Komolafe, Oladapo; Velasquez-Orta, Sharon B.; Monje-Ramirez, Ignacio; YañezNoguez, Isaura; Harvey, Adam P.; Orta-Ledesma, María T. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, 154 (2014) 297-304.

Kumar Gupta, Sanjay; Kumar, N. Mithil; Guldhe, Abhishek; Ahmad Ansari, Faiz; Rawat, Ismail; Bux, Faizal. Wastewater to biofuels: Comprehensive evaluation of various flocculants on biochemical composition and yield of microalgae. *Ecological Engineering*, 117 (2018) 62-68.

Kumar Narahariseti, Pavan; Das, Probir; Sharratt, Paul N. Critical factors in energy generation from microalgae. *Energy*, 120 (2017) 138-152.

Kumari, P.; Kumar, M.; Reddy, C.; Jha, B. Algal lipids, fatty acids and sterols. In: *Functional ingredients from algae foods and nutraceuticals*. Woodhead publishing limited, (2013) 87-134.

Laamanen, Corey A.; Ross, Gregory M.; Scott, John A. Flotation harvesting of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58 (2016) 75-86.

Langlais, Bruno; Reckhow, David A.; Brink, Deborah R. *Ozone in water treatment: Application and engineering*. Francia: AWWA research foundation (1991) p.p. 552.

Lapuerta, Magin; Rodríguez-Fernández, José; Armas, Octavio. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. *Chemistry and Physics of Lipid*, 163 (2010) 720-727.

Lee, Robert Edward. *Phycology*. New York, USA: Cambridge University Press. (2008) p.p. 561.

Liang, Jiaming; Tumpa, Fahmida; Péres Estrada, Leonidas; El-Din, Mohamed Gamal; Liu, Yang. Impact of ozonation on particles aggregation in mature fine tailings. *Journal of Environmental Management*, 146 (2014) 535-542.

Long, Hailing; Li, Xiaobing; Wang, Hong; Jia, Jingdun. Biomass resources and their bioenergy potential estimation: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26 (2013) 344-352.

Markou, Giorgos; Georgakakis, Dimitris. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88 (2011). 3389-3401.

Mata, Teresa M.; Martins, Antonio A.; Caetano, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2010) 217-232.

Miao, Hengfeng; Tao, Wenyi. The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal. *Separation and purification technology*, 66 (2009) 187-193.

Mishra, Sanjiv K.; Suh, William I.; Farooq, Wasif; Moon, Myoungsoon; Shrivastav, Anupama; Park, Min S.; Yang, Ji-Wong. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155 (2014) 330-333.

Moroney, James V.; Somanchi, Aravid. How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation?. *Plant Physiology*, 119 (1999) 9-16.

- Mulligan, Catherine N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133 (2005) 183-198.
- Murugesan, A., Umarani, C., Subramanian, R.; Nedunchezian, N. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines- A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13 (2009) 653-662.
- Muylaert, K.; Bastiaens, L.; Vandamme, D.; Gouveia, L. Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Woodhead Publishing Series in Energy, (2017) 113-127.
- Nava Bravo, Isaac. *Balance energético de producción de biodiesel a partir de microalgas separadas del medio acuoso*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México (2015).
- Nava Bravo, I., Velásquez-Orta, S., Monje-Ramírez, I.; Orta Ledesma, M. Comparative analyses of energy consumption in main steps of microalgae biodiesel production using ozone-flotation and wastewater (2017).
- Nguyen, Truch Linh; Lee, D.J.; Chang, J.S.; Liu, J.C. Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 105 (2013) 246-250.
- Orta Ledesma de Velásquez, María Teresa; Monje-Ramírez, Ignacio; Velásquez-Orta, Sharon; Rodríguez-Muñoz, Verónica; Yáñez-Nogues, Isaura. Ozone for microalgae Biomass Harvesting from Wastewater. *Ozone: Science and Engineering*, 39, (2017) 264-272.
- Ozkan, Altan; Berberoglu, Halil. Cell to substratum and cell to cell interactions of microalgae. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 112 (2013) 302-309.
- Pardo-Cervantes, A.; Viades-Trejo, J.; Gracia-Fadrique, J. Activity coefficients at infinite dilution and critical micelle concentrations of Poly(oxy-1,2-ethanedyl), α -Tridecyl- ω -hydroxyethers ($C_{13}E_{i-610,18}$) in aqueous media by the volmer surface equation of state and group contributions. *Journal of chemical and engineering data*, 56 (2011) 2812-2817.
- Patel, Akash; Gami, Bharat; Patel, Pankaj; Beena, Patel. Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71 (2017) 535-547.
- Phoochinda, W. & White, D. A. Removal of algae using froth flotation. *Environmental Technology*, 24 (2003) 87-96.
- Pires, José. CM. Mass production of microalgae. In: *Handbook of marine microalgae, Biotechnology advances*. s.l.:Elsevier. (2015) p.p. 55-68.
- Pittman, Jon K.; Dean, Andrew P.; Osundeko, Olumayowa. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102 (2011) 17-25.
- Plummer, Jeanine D.; Edzwald, James K. Effects of chlorine and ozone on algal cell properties and removal of algae by coagulation. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 51 (2002) 307-318.

- Prabandono, Kurniandhi; Amin, Sarmidi. Biofuel production from microalgae. En: *Handbook of marine microalgae biotechnology advances*. United States of America: Elsevier Inc. (2015) pp. 145-158.
- Pragya, Namita; Pandey, Krishan K.; Sahoo, P.K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24 (2013) 159-171.
- Quinn, Jason C.; Smith, T. Gordon; Downea, Cara Meghan; Quinn, Casey. Microalgae to biofuels lifecycle assessment-Multiple pathway evaluation. *Algal Research*, 4 (2014) 116-122.
- Rashid, Naim; Rehman, Muhammad Saig Ur; Sadiq, Madeha; Mahmood, Tariq; Han, Jong-In. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40 (2014) 760-778.
- Rawat, I.; Kumar, Ranjith R., Mutabda, T.; Bux, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(2011) 3411-3424.
- Refaat, A.A. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. *Environmental Science Technology*, 6 (2009) 677-694.
- Rodríguez Muñiz, Verónica. *Separación de microalgas por ozonoflotación en un reactor tipo espumador para la producción de biodiesel*. Mexico, DF: Universidad Nacional Autónoma de México (2015).
- Roshchina, Victoria V.; Roshchina, Valentina D. *Ozone and plant cell*. Rusia: Springer-Science+Business Media B.V (2003)
- Sadowska, Justyna; Johansson, Bjarne; Johannessen; Espen; Firman, Rauno; Broniarz-Press, Lubomira; Rosenholm, Jarl B. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. *Chemistry and physics of lipids*, 151 (2008) 85-91.
- Safi, Carl; Charton, Michael; Ursu, Alina Violeta; Laroche, Céline; Zebib, Bachar; Pontalier, Pierre-Yves; Vaca-García, Carlos. Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Research*, 3 (2014) 55-60.
- Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B.; Vargas, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, 35 (2011) 291-311.
- Show, Kuan-Yeow; Lee, Duu-Jong. Algal Biomass Harvesting. *Biofuels from algae* (2014) pp. 85-110.
- Singh, Bhaskar; Guldhe, Abhishek; Rawat, Ismail; Bux, Faizal. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29 (2014) 216-245.
- Singh, G. & Patidar, S. Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217 (2018) 499-508.
- Slade, Raphael; Bauen, Ausilio. Micro-algae for biodiesel: Cost, energy, balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, 53 (2013) 29-38.

- Soriano Jr, Nestor U.; Migo, Veronica P.; Matsumura, Matsumura Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. *Chemistry and lipids physics of lipids*, 126 (2003) 133-140.
- Strzalka, Rafal; Schneider, Dietrich; Eicker, Ursula. Current status of bioenergy technologies in Germany. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72 (2017) 801-820.
- Suali, Emma; Sarbatly, Rosalam. Conversion of microlagae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16 (2012) 4316-4342.
- Sudhakar, K.; Mamat, R.; Samykano, M.; Azmi, W.H.; Ishak, W.FM; Yusaf, Talal. An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91 (2018) 165-179.
- Tenney, Mark W.; Echelberger, Wayne F.; Schuessler, Ronald G.; Pavoni, Joseph L. Algal flocculation with synthetic organic polyelectrolytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 18 (1969) 965-971.
- These, Anja; Reemtsma, Thorsten. Structure-Dependent reactivity of low molecular weight fulvic acid molecules during ozonation. *Environmental Science and Technology*, 39 (2005) 8382-8387.
- Uduman, Nyomi; Qi, Ying; Danquah, Michael K.; Forde, Gareth M.; Hoadley, Andrew. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Renewable and Sustainable Energy*, 2 (2010) 1-15.
- Uzun, Hicran; Ibanoglu, Esra; Catal, Hatice; Ibanoglu, Senol. Effects of ozone on functional properties of proteins. *Food chemistry*, 134 (2012) 647-654.
- Valeriano González, María. Teresa. *Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en ácidos grasos precursores de biodiesel durante la separación de microalgas mediante ozoflotación*. México: Tesis Maestría UNAM (2013).
- Vandamme, Dries; Foubert, Imogen; Muylaert, Koenraad. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Cell Press*, 31 (2013) 233-239.
- Vaultier, Marie-Noelle; Jolivet, Yves. Ozone sensing and early signaling in plants: an outline from the cloud. *Environmental and Experimental Botany*, 114 (2015) 144-152.
- Velasquez-Orta, S.B.; Garcia-Estrada, R.; Monje-Ramirez, I; Harvey, A; Orta Ledesma, M.T. Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries. *Biomass and Bioenergy*, 70 (2014) 356-363.
- Velasquez-Orta, S.B.; Lee, J.M.G.; Harvey, A. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, 94 (2012) 544-550.
- Viades-Trejo, J.; Gracia-Fadrique, J. A new surface equation of state: hydrophobic-hydrophilic contributions to the activity coefficient. *Fluid phase equilibria*, 264 (2008) 12-17.
- von Gunten, Urs. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water research*, 37 (2003) 1443-1467.

von Sonntag, C.; von Gunten, U. *Chemistry of ozone in water and wastewater treatment*. Great Britain : IWA publishing (2012).

Wang, Mingzi; Yang, Yi; Chen, Zhihong; Chen, Yanzhen; Wen, Yangmin; Chen, Bilian. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. *Bioresource Technology*, 222 (2016) 130-138.

Wayne Chew, Kit; Ying Yap; Jing; Mostrar, Pau Loke; Suan, Ng Hui; Juan, Joo Ching; Ling, Tau Chaun; Lee, duu-Jong; Chang, Jo-Shu. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229 (2017) 53-62.

Weschler, Matthew K.; Barr, William J.; Harper, Willie F.; Landis, Amy E. Process energy comparison for the production and harvesting of algal biomass as a biofuel feedstock. *Bioresource Technology*, 153 (2014) 108-115.

Wierenga, P.A.; Gruppen, H. New views on foams from protein solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15 (2010) 365-373.

Wilde, P.J. Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current opinion in Colloid and Interface Science*, 5 (2000) 176-181.

Yaakob, Zahira; Narayanan, Binitha; Padikkaparambil, Sillija; Unni, Surya K.; Akbar, Mohammed. A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35 (2014) 136-153.

Yusuf, N.N.A.N.; Kamarudin, S.K.; Yaakub, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 52 (2011) 2741-2751.

Zayas, Joseph F. Foaming properties of proteins. In: *Functionality of proteins in food*. Springer Verlag (1996) p.p. 260-309.

Zhang, Xuezi; Amendola, Pasquale; Hewson, John C.; Sommerfeld, Milton; Hu, Qiang. Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresource Technology*, 116 (2012) 477-484.

Zhang, Xiaolei; Yan, Song; Tyagi, Rajeshwar D.; Surampalli, Rao Y. Energy balance and greenhouse gas emissions of biodiesel production from oil derived from wastewater and wastewater sludge. *Renewable Energy*, 55 (2013) 392-403.

ZHU, Junying; RONG, Junfeng; ZONG, Baoning. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis*, 34 (2013) 80-100.

9 PUBLICACIÓN INTERNACIONAL DEL TRABAJO DE TESIS.



Research paper

Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction



M.T. Valeriano González ^a, I. Monje-Ramírez ^a, M.T. Orta Ledesma ^a, J. Gracia Fadrique ^b, S.B. Velásquez-Orta ^{c,*}

^a Instituto de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-472, Coyoacán 04510, DF, Mexico

^b Facultad de Química, Departamento de Fisicoquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-197, Coyoacán 04510, DF, Mexico

^c School of Chemical Engineering and Advanced Materials, Newcastle University, Apartado Postal 70-197, 04510 Coyoacán, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2016

Received in revised form

21 September 2016

Accepted 26 September 2016

Available online 4 October 2016

Keywords:

Ozoflotation

Microalgae biomass

Protein

Lipids

Surface tension

ABSTRACT

In this paper, a mixed microalgal consortium (including cyanobacteria) was separated from treated wastewater by ozoflotation to evaluate the method's effect on protein excretion, lipids extraction, and cell recovery. Microalgae suspensions obtained from an artificial lake, Lake Nabor Carrillo, were subjected to different ozoflotation conditions (0.028–0.136 mg O₃/mg biomass). During ozoflotation, proteins released exhibited surfactant activity in the water disrupting the surface tension of water to values of 42.73 mN/m. A critical micelle concentration (CMC) of at least 550 ± 17 mg protein/L was needed to produce foaming and biomass separation of the aqueous medium. The C-Phycocyanin beta chain was identified as one of the main proteins released during the ozoflotation process. Biomass recovery was found to be directly proportional to the ozone dose; best results (75% as TSS) were obtained at the highest dose used (0.14 mg O₃/mg biomass). In contrast, the best lipid recovery (16% mg lipid/mg biomass) was achieved when using low ozone doses (0.047 mg O₃/mg biomass).

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microalgae biomass harvesting is a critical step in the production of third-generation biofuels. For example, it has been reported that harvesting contributes between 20 and 30% of the total cost of biodiesel production [1]. Conventional harvesting techniques include centrifugation, coagulation-flocculation, filtration, sedimentation and dissolved air flotation. However, these methods have several disadvantages such as the addition of chemicals to biomass harvested, low efficiency, high water content, high retention time, high energy consumption and scaling problems [2,3].

Ozoflotation is an alternative method of harvesting microalgae, which was first reported in 1980s [4]. Since then, there has been increased interest in using ozone to harvest microalgal biomass [5–8]. Ozone doses tested in studies range between 0.005 and 0.5 mg O₃/mg biomass depending on the bulk liquid and microalgae source, type, and concentration. Betzer et al. [4] showed that ozoflotation could achieve 98% removal of microalgae, as well as

solids and total coliforms, from oxidation pond effluents. Cheng et al. [7,8], reported that the harvesting of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* using dispersed flotation was not successful when using air alone and required the use of ozone doses. Additionally, the authors reported the effect of ozone on changing the zeta potential through the release of proteins and polysaccharides from microalgae. Velásquez-Orta et al. [5] found that ozone concentration and ozonation time were the main variables affecting microalgae yield when harvesting native mixed microalgae from wastewater.

Ozoflotation is a physicochemical process that combines the physics of flotation with the chemical oxidative properties of ozone. The oxidative cell damage triggered by ozone is responsible for algal cell lysis and the release of biopolymers like proteins, lipids, carbohydrates, and DNA [9]. Another phenomenon that occurs during microalgae ozoflotation is foaming, which promotes recovery of the biomass from the culture broth. Cheng et al. [7,8], suggested that the proteins released by cell lysis act as surfactants. These proteins cause the surface of the bubble to become increasingly hydrophilic, which makes bubble-cell collisions more effective, thus forming a layer of foam on the surface where microalgae

* Corresponding author.

E-mail address: sharon.velasquez-orta@ncl.ac.uk (S.B. Velásquez-Orta).

cells concentrate. Surfactant proteins can decrease the surface tension and contribute to the stability of emulsions or the presence of foam by increasing their viscosity and strength. In fact, protein foamability has been correlated to a decrease in surface tension [10]. However, to date, the surfactant capacity of proteins has not been quantified nor characterized in microalgae recovery by ozoflotation.

Both, Cheng et al. [7] and Velásquez-Orta et al. [5] found that ozoflotation improved lipids recovery after extraction and modified the fatty acid methyl ester (FAME) profile. Cheng et al. [8] found that, the fraction of fatty acid C16:0 in *Chlorella vulgaris* cells increased to more than 55% of total lipids. Velásquez-Orta et al. [5] observed that the amount of extracted lipids increased to 50% (with respect to centrifugation) when microalgae was harvested by ozoflotation; however, an excess of ozone (>0.24 mg O₃/mg dried biomass) had the opposite effect. Komolafe et al. [6] reported that the use of ozoflotation as a method of harvesting microalgae increases the degree of saturation in the FAME extracted. Sadowska et al. [11] also reported that exposure of vegetable oils to ozone had decreased the degree of unsaturation of the oils. This indicates that determining the ideal ozone condition should not only consider an increase in the quantity of lipids extracted, but also the release of proteins; all while assuring the quality of the harvested biomass (e.g. lipid FAME profile). It is noteworthy that ozoflotation as harvesting method has some drawbacks such as high-energy consumption; Nava et al. [12] reported that ozoflotation has an energy cost of 9.1 kWh/m³. The aim of this work is to identify, for the first time, proteins released during ozoflotation and evaluate their surfactant capacity as well as to establish a relationship between surfactant protein released, biomass, and lipids recovery.

2. Methodology

2.1. Microalgae samples

A native consortium of microalgae from the “Lago Nabor Carrillo” (an artificial lake fed with treated wastewater located in Texcoco, Mexico) was used in this study. During April 2014, samples of the native consortium were taken from the lake each week, immediately stored at 4 °C and processed the following day. The concentration of biomass as total suspended solids (TSS), was determined gravimetrically using standard methods [13]. Results showed an average TSS concentration of 400 ± 20 mg/L. Microorganisms were identified and counted using a microscope (Leitzlaborlux S, Germany). It was found that cyanobacteria (i.e., *Arthrospira* sp. *Spirulina* sp. *Oscillatoria* sp.) and green algae (i.e., *Desmodesmus* sp. *Scenedesmus* sp.) were the most abundant phyla.

2.2. Harvesting by ozoflotation

Ozoflotation experiments were conducted using 950 ml of fresh homogenized suspensions of mixed microalgae. Batch flotation tests used a specially designed 1.3 L glass column reactor (height: 66 cm; inner diameter: 4.9 cm). For ozoflotation, lab-scale experiments used a Labo 76 ozone generator (Emery Trailigaz, USA) with a production capacity of 19 g O₃/h. Ozone injected at a flow rate of 0.2 L/min using a glass diffuser (10–15 μm pore-sizes) located at the bottom of the column, Fig. 1. The ozone concentration in the gas phase was determined using the Iodometric Method [14].

In the harvesting process, two types of samples were taken: the first sample, “concentrated protein”, contained the cell biomass and proteins dissolved in the bulk liquid recovered from the top of the reactor; the second sample, “reactor protein”, contained the proteins that remained in the column bulk liquid. At the end of each experiment, total protein concentration and surface tension were

measured in both samples.

The percentage of microalgal biomass harvested was calculated by subtracting the TSS content in the initial sample from the TSS remaining in the ozoflotation reactor.

2.3. Experimental design

Biomass and lipid recovery were evaluated using the response surface method with a two factorial central composite rotational design (CCRD). The design involved carrying out 13 experiments, each with three replicates. These included five central points and an axial point, with a selected α of 1.68. It resulted in a total of nine tests, involving ozone concentrations in the gas phase and ozonation times between 3 and 7 mgO₃/L and 15–35 min, respectively. The influence of these two operating variables were determined for the following responses: 1) amount of proteins released, 2) cell biomass recovery, and 3) amount of lipids extracted. Minitab 17 statistical software was used to perform an analysis of variance.

2.4. Surface tension of proteins

Surface tension was measured in samples of proteins obtained by separating the microalgae from its natural environment (treated wastewater) and using the pre-washed biomass to eliminate possible interference of the constituents present in treated wastewater (eg. detergents). The washing consisted of removing water by centrifugation and re-suspending the pellet in distilled water; the procedure was repeated three times. Finally, 40 L of microalgae suspension were prepared at a concentration of 400 mg TSS/L in distilled water for ozoflotation tests. Surface tension tests were conducted for all protein samples obtained.

Samples from the reactor and concentrated protein were filtered using a 0.22 μm Millipore membrane (GVWP02500) and total protein was quantified using the Biuret method (Merck 1103070500), according to the manufacturer's specifications.

The surface tension was determined according to Pardo-Cervantes et al. [15]. Samples were allowed to rest at least 2 h at room temperature (20 ± 2 °C) in a Petri dish to allow proper equilibrium. The Ring method was chosen to evaluate surface tension. Equipment was assembled using a balance (Adventurer, Ohaus, Pine Brook, NJ) with a hook underneath to hang the DuNouy platinum ring (CSC Scientific Co. Inc., USA) having a 5.992 cm mean circumference and an $R/r = 53.6$. Samples were placed on a platform with a speed-controlled elevator (Orbisphere Labs., Neuchatel/Geneva, Switzerland) which pushed samples until a distance between the sample's surface and the ring was reached. The platform descended and the maximum weight pulled by the ring was registered. Surface tension was determined using equation (1).

$$\sigma = \frac{Mg}{4\pi R} * F \quad (1)$$

Where M is the maximum weight supported by the ring, g is the local gravity (977.94 cm/s², UNAM), R is the radius of the ring and F is a correction factor that adjusts the size of the ring (R^3/V , where V is the maximum volume supported by the ring), obtained from tables [16].

In order to determine the concentration of protein necessary to lower surface tension as well as the ozone dose needed for microalgae separation, the critical micelle concentration (CMC) was determined. CMC is the minimum concentration that triggers micelle formation [17] and was calculated using equation developed by Viades-Trejo and Gracia-Fadrique [18].

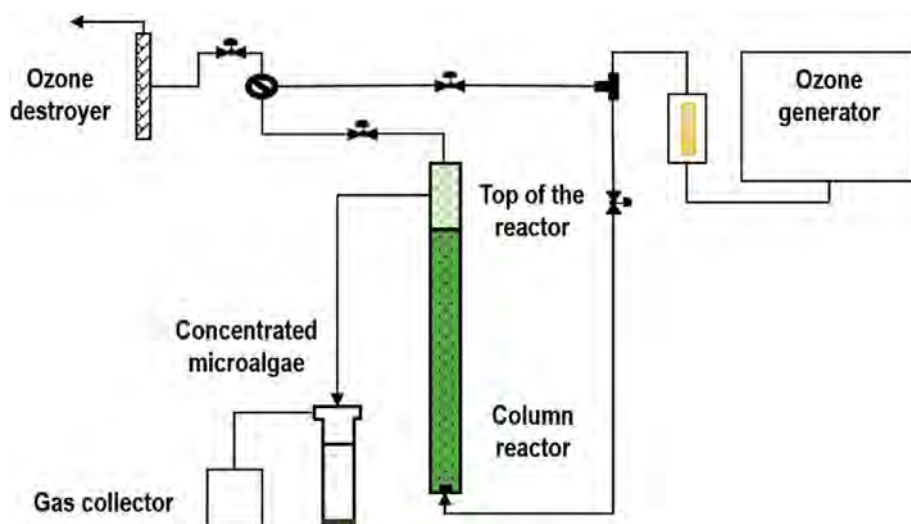


Fig. 1. Experimental setup for testing the ozoflotation with microalgae.

2.5. Identification of protein released by ozoflotation

Total protein released into aqueous medium was identified after ozoflotation using three different doses of ozone (27.8 mgO₃/L, 43.3 mgO₃/L and 54.4 mgO₃/L). To validate that proteins identified were released by the breakage of cells due to ozone, the values were compared with microalgae proteins extracted by a conventional alkaline method [19]. In the alkaline method, a solution of 50 mL of NaOH/water at pH 12 was added to 1 g of dry microalgal biomass. The sample was heated at 40 °C with stirring for one hour. Extracted proteins were recovered from the aqueous phase by centrifugation at 5000g for 10 min.

Proteins were isolated using the technique of polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) at 12%. Twenty-five microliters of total proteins obtained from the concentrated samples were injected to an electrophoresis gel, along with a marker of molecular weight ranging from 15 to 250 KDa (Dual-color, BioRad). Electrophoresis was performed at 45 V for 24 h at room temperature in a running buffer SDS-PAGE, on a 600 SE Vertical Unit (GE-Healthcare). The SDS-PAGE was stained with Coomassie blue.

Next, the SDS-PAGE bands of interest were excised with a sterile scalpel and were treated with gel trypsin digestion. Gel digestion was performed with modified porcine trypsin 30 μL in a solution containing 20 ng/μL. Samples were incubated at 37 °C for 18 h.

The identification of proteins was performed using tandem mass spectrometry (LC/MS/MS); a nano-LC-ESI-MS/MS integrated system (Mass Spectrometer/flight time, SYNAPT G2 HD, Waters Corporation) equipped with a NanoLockSpray ion source; and a nanoACQUITY-UPLC (Waters Corporation).

Results were processed through ProteinLynx Global software (PLGS) (Waters Corporation) and compared with the database UNIPROT. Peptides were considered a match to the PLGS scores at a 96% confidence level or higher.

2.6. Lipid extraction of microalgae biomass

Microalgae separated by ozoflotation were centrifuged at 15,000g at 20 °C for 10 min using a Beckman Coulter centrifuge (AVANTI-J26S XPI). Biomass was oven dried at 50 °C. Lipid extraction was performed using a homogeneous solution of chloroform-methanol ratio of 2:1 (v/v) [6]. The volume of the chloroform and

methanol solution was 45 times the mass of the solution. Therefore, for 1 g of algae biomass, the volumes of chloroform and methanol were 30 mL and 15 mL, respectively. The solution was left overnight in the fridge at a temperature of 4 °C. After overnight extraction, samples were vacuum filtered using a Whatman glass microfibre filter paper. The filtrates were poured into separating funnels and a weak salt solution of potassium chloride (KCl, 0.88 vol%) was added at 25% of the starting weight. The solutions were well mixed and allowed to separate into two layers. Lipid layers were carefully removed into pre-weighed conical flasks and left to dry in a fume cabinet until constant weight. The mass of lipids in microalgae species was finally obtained by deducting the vessel weight from the final constant weight.

3. Results and discussion

3.1. Protein release during ozoflotation

During microalgae ozoflotation, an intense foaming due to the release of proteins was observed; this was confirmed by quantifying the total protein content. As was previously reported, this foaming contributed to the separation and concentration of microalgae [7,8]. In this study, the percentage of recovered biomass and protein concentration in the “concentrate protein” was observed to increase proportionally according to the ozone dose (Fig. 2). A direct relationship was obtained between the protein concentration and the recovery of biomass. A maximum concentration of 2.5 g/L of “concentrated protein” was obtained from the microalgal biomass at the end of the ozoflotation (Fig. 2). There were also 351 mg/L of “reactor protein” after the ozoflotation process, a value 7 times lower than the maximum “concentrated protein” yield.

3.2. Surfactant effect of proteins in the ozoflotation

Proteins are amphiphilic molecules that reduce surface tension and promote foaming [17], allowing microalgae separation from the aqueous medium. In this paper, the surface tension was measured in samples of proteins obtained by ozoflotation of microalgae from its natural environment (treated wastewater) and from pre-washed microalgae, to eliminate possible interference of the constituents present like detergents. As can be seen in Fig. 3, the

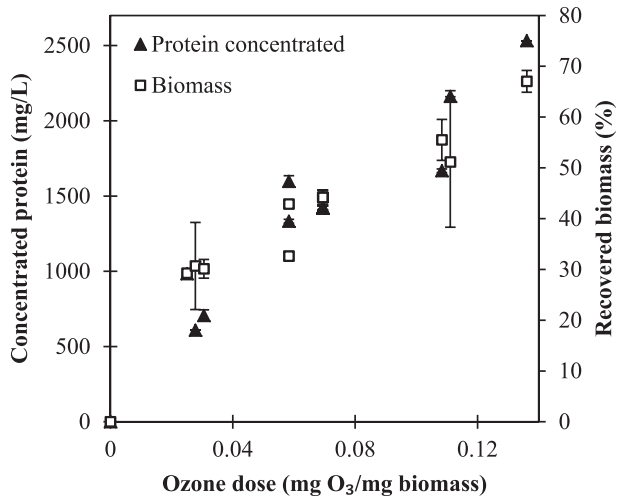


Fig. 2. Relationship between the recovery of biomass and protein concentration during ozoflotation of the "concentrated protein". Standard deviations are indicated by error bars.

surface tension in all protein samples decreased with an increasing ozone dose, which could be associated to the higher protein content in the samples (see Fig. 2). For both samples (washed and unwashed microalgae), a similar behavior is observed; the analysis of variance indicated no significant difference between them (p -value = 4.13). This means that changes in the surface tension during ozoflotation were primarily attributable to the proteins released by ozone, and not to the chemicals present in wastewater.

On the other hand, Fig. 4 shows the effect of protein concentration on the reduction of surface tension, from 65.71 mN/m (initial value) to values of 42.73 mN/m and 50.04 mN/m, in samples of proteins, obtained from ozoflotation of unwashed and washed microalgae, respectively. Foegeding et al. [20] reported that proteins in solution reduce the surface tension of distilled water from 72 mN/m to approximately 45 mN/m. Chronakis et al. [21] also showed a decrease of surface tension to 37.5 mN/m, using microalgae proteins obtained by alkaline extraction.

Results indicate that a CMC of 550 ± 17 mg/L of microalgae protein is required to reduce the surface tension of water to 42 mN/m, which is achieved with an ozone dose of 0.025 mg O₃/mg

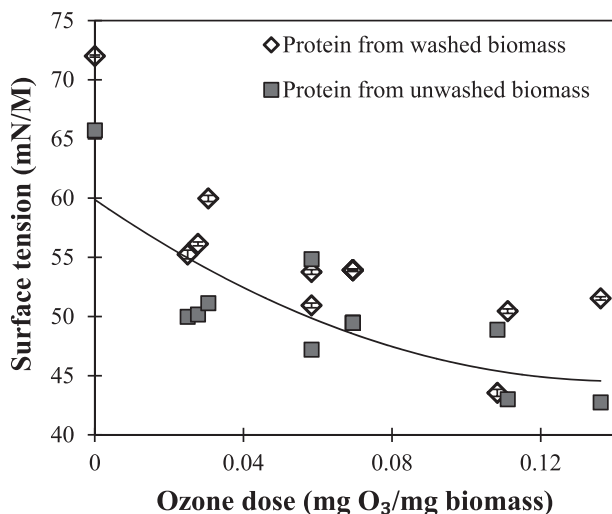


Fig. 3. Effect of the ozone dose in the reduction of surface tension by the effect of the protein released from microalgae. Standard deviations are indicated by error bars.

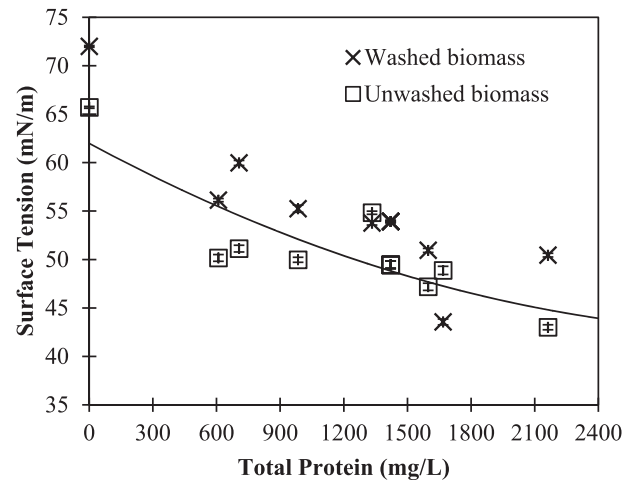


Fig. 4. Reduction of the surface tension according to the concentration of protein released during ozoflotation. Standard deviations are indicated by error bars.

biomass. Higher ozone doses produced a higher concentration of surfactant with no significant effect in surface tension; however, an increased ozoflotation time was necessary to complete biomass harvesting. It is reported that increased protein concentrations generate more stable and dense foam [10].

3.3. Identification of proteins released by ozoflotation

Results of SDS-PAGE gel of the different protein samples are shown in Fig. 5. In the alkaline extract (A), two bands between

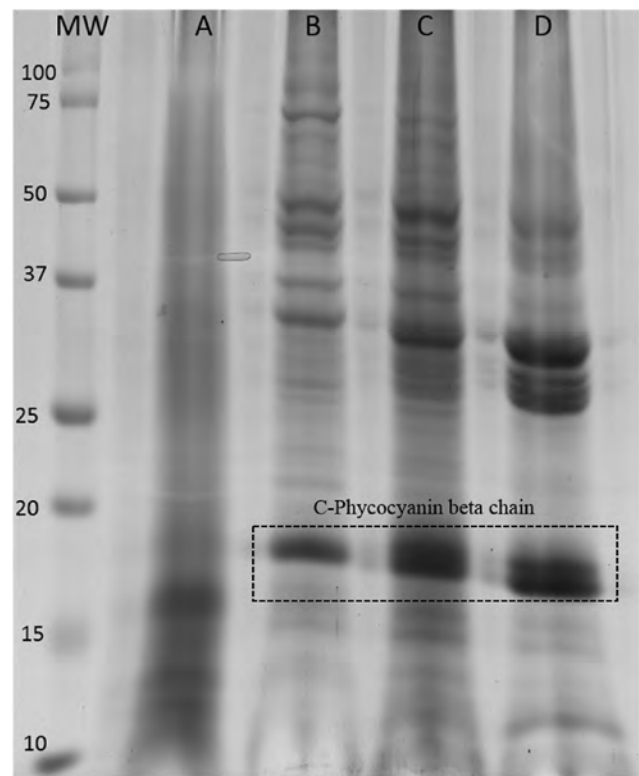


Fig. 5. SDS-PAGE gel of samples of microalgae protein: Dual Color, Bio-Rad molecular weight marker, kDa (MWM); alkaline extract, without ozone (A); Ozoflotation: 0.0695 mg O₃/mg biomass (B), 0.1082 mg O₃/mg biomass (C), and 0.136 mg O₃/mg biomass (D).

Table 1

Experimental significance of tested variables in ozoflotation. Variables tested were ozone concentration and ozonation time; responses were biomass and lipid recoveries. The confidence level used was 95%.

	Biomass recovery (TSS %)		Lipid recovery (%)	
	F-ratio	p-value	F-ratio	P-value
A: Ozone concentration	79.91	0.0000	0.41	0.5432
B: Ozonation time	52.09	0.0002	64.88	0.0001
AA	1.16	0.3176	16.50	0.0048
AB	11.40	0.0118	5.31	0.0547
BB	0.04	0.8411	16.36	0.0049

molecular weights of 15 and 10 kDa, were detected. Conversely, multiples bands of proteins, depending on the ozone dose used on microalgae ozoflotation were observed. When we use low ozone dose (B), an important number of proteins, with molecular weight between 10 and 100 kDa, were identified; seven proteins are the more relevant. The effect of ozoflotation is observed as an intensifying band in the three samples around the 20 and 37 kDa which shows higher accumulation with an increasing ozone dose (Fig. 5B, C, and D). This was possibly due to higher cell damage and protein concentration release. On the other hand, the bands around 75 kDa disappear with excess ozone dose. We suggest this effect is a result of possible per-oxidation of the proteins.

The protein identified when using alkaline extraction (A) was RuBisCo (ribulose 1,5 biphosphate carboxylase-oxygenase (MW: 56 kDa). This protein is contained in the carboxysomes of the cyanobacterias of genus *Cyanothece* sp. [22]. Other proteins like RuBisCo were identified in the alkaline extract such as Allophycocyanin beta chain (MW: 17 kDa) and the C-phycoyanin alpha chain (MW: 17.3 kDa), from *Arthrospira platensis* cyanobacteria.

The main protein obtained after ozoflotation (B, C, and D) was identified as the C-Phycocyanin beta chain with a molecular weight of 18 kDa, a biliprotein (pigment) normally found in the cell wall of cyanobacteria [23]. These results suggest that ozone acts on the cell wall, which contains the C-phycoyanin beta chain. It follows that, the ozoflotation process specifically promotes the release of surfactant proteins located in the cell wall of microalgae.

3.4. Biomass and lipid recovery by ozoflotation

Previous studies by Velásquez-Orta et al. [5] found a maximum

recovery of biomass (79%) and lipids (12%) when using doses of 0.23 mg O₃/mg biomass. In addition, these studies revealed that a dose of >0.24 mg O₃/mg biomass decreased lipid recovery.

In this paper, ozoflotation was studied using low ozone doses (0.023–0.123 mg O₃/mg of dried biomass) using the critical micellar concentration (CMC) of the surfactant protein as a starting point. Table 1 shows the effect of tested variables (ozone concentration and ozonation time) in the recovery of biomass (TSS%) and lipids (%).

With regards to the recovery of biomass, three effects were found to be significant in the following order: ozone concentration (A), with a p-value of 0.000; ozonation time (B), with a p-value of 0.002; and finally AB interaction, with a p-value of 0.01. Similarly, ozonation time (B) was found to have a significant effect on the recovery of lipids (p-value <0.05). According to Pareto charts (results not shown), the variable B negatively affected lipid recovery.

Fig. 6 shows the model response surface, indicating that the maximum recovery of biomass (75%) was obtained with an ozone concentration of 7.53 mgO₃/L and ozonation time of 37.6 min, equivalent to a dose of 0.142 mgO₃/mg biomass. On the other hand, the highest lipid recovery (16%) was achieved with a low dose of ozone (0.047 mgO₃/mg biomass). The results of biomass harvesting and recovery of lipids were similar to those reported by Velásquez-Orta et al. [5], but using 1.6 to 4.9 times less ozone doses. In previous studies, Cunha et al. [24] observed that high ozone doses produce lipid oxidation, for this reason, low doses of ozone were chosen to permit membrane lysis for surfactant protein release (biomass recovery) and lipid recovery while avoiding lipid oxidation.

As seen in Fig. 7, a higher recovery of microalgal biomass (Fig. 7A) did not result to an increase in lipid recovery (Fig. 7B). In fact, lipid recovery decreased with an increasing dose of ozone (>0.058 mg O₃/mg biomass). The same behavior was reported in Velásquez-Orta et al. [5], but with higher ozone doses (>0.25 mg O₃/mg biomass). Fig. 7C shows that, in this case, the harvested biomass had lower lipid content when recovered at higher doses of ozone. Lipid reduction can be attributed to a possible lipid peroxidation. It has been reported that the major target for lipid peroxidation occurs in unsaturated fatty acids. Lipid peroxidation was previously observed with prolonged ozone exposure times (20–30 min) [24,25].

Taking into account the efficiency of the process (Fig. 7D), in both cases the best results were obtained with low doses of ozone

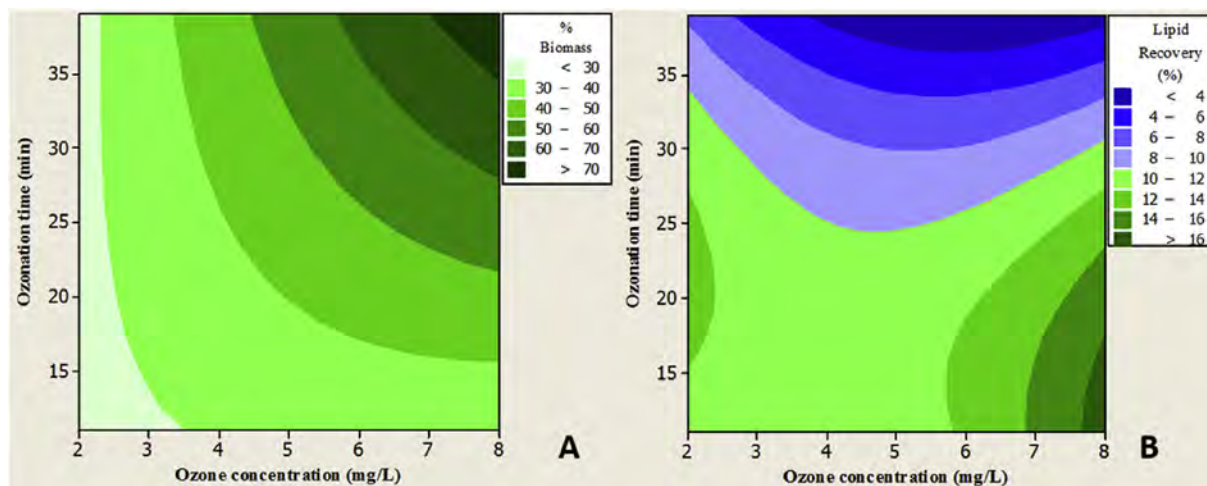


Fig. 6. Recovery of biomass (A) and lipid (B) versus time and ozone concentration of ozoflotation respectively. Contours show estimates of response surface for the recovery of biomass and lipid.

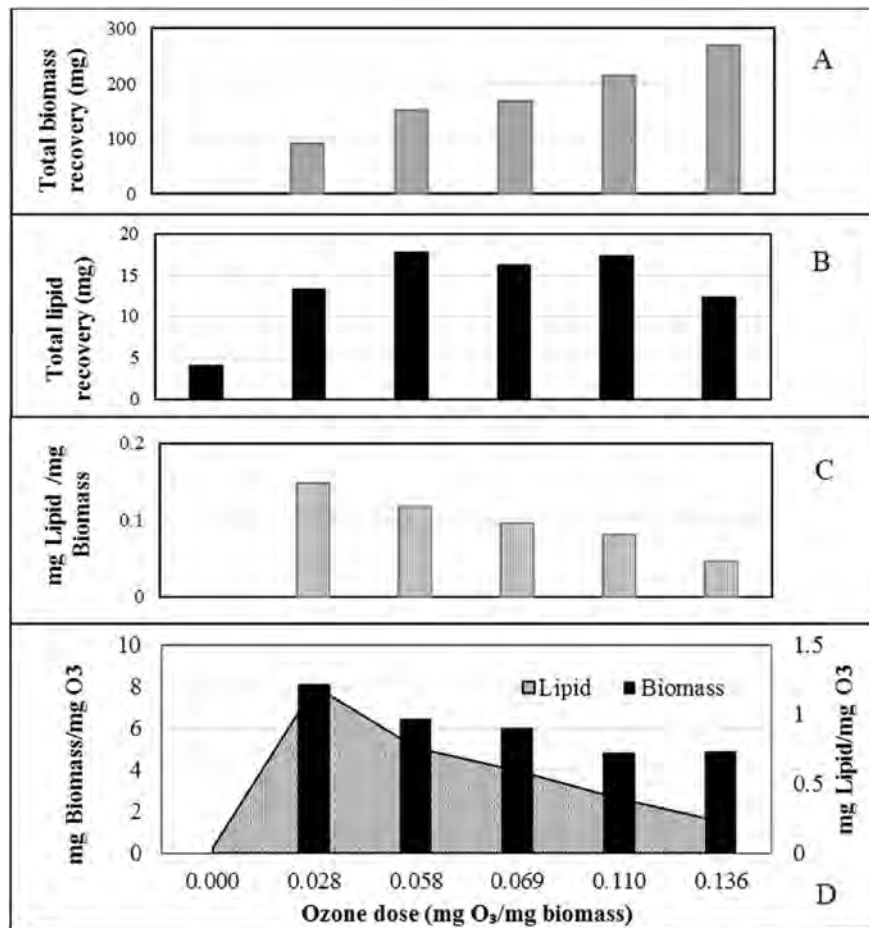


Fig. 7. Effect of the ozone dose to microalgae: A. Recovery of biomass, B. Recovery of lipids, C. Recovery of lipid per biomass, and D. Recovery efficiency.

(0.028 mg O₃/mg biomass). These results were consistent with those reported in the literature for microalgae biomass recovery [4,7,8]. However, the link between harvested biomass and lipid recovery by ozoflotation is still incipient and must be further studied. These results indicate that even at low ozone dose lipid recovery is affected (Fig. 7C). It seems that high exposure to ozone, either by the use of high concentrations in the gas phase or by prolonged ozonation time, negatively affects the quantity of lipids extracted from the microalgal biomass harvested. Therefore, further research is needed to achieve a good biomass recovery with high lipid content.

4. Conclusions

The surfactant effect of protein released during the ozoflotation of microalgae was found to decrease the surface tension of the system (42 mN/m) thereby promoting foaming and biomass recovery. Beta C-Phycocyanin was the main protein identified to be released during the ozoflotation process. The critical micelle concentration (CMC) of 550 ± 17 mg/L was achieved using ozone dose of 0.025 mg O₃/mg biomass. The highest percentages of biomass recovery were achieved at ozone doses of 0.142 mg O₃/mg biomass. However, a high exposure of biomass to the oxidizing effect of ozone was found to impact lipid recovery. The best recovery efficiencies of microalgal biomass and lipids were respectively: 8 mg biomass/mg O₃ and 1.25 mg lipids/mg O₃.

Acknowledgements

The authors acknowledge MEng. Andrés Velasco Medina for his support in conducting tests on surface tension in the Surface Phenomena Laboratory at the Faculty of Chemistry. Likewise, we recognize Dr. Jorge Herrera Diaz from USAI in the Faculty of Chemistry, UNAM, for his valuable help in the proteins identification; and thank MSc. Isaura Yañez-Noguez for her help on microalgae identification. Dr. Velasquez Orta appreciates the researcher links travel grant provided by the Newton Fund (165933494). Finally, this work was supported by the Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética, project 220704.

References

- [1] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production, *Fuel* 103 (2013) 444–467.
- [2] A. Barros, A. Goncalves, M. Simoes, J. Pires, Harvesting techniques applied to microalgae: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41 (2015) 1489–1500.
- [3] M. Gerardo, S. Van Den Hende, H. Vervaeren, T. Coward, S. Skill, Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: a review of the developments and case studies from pilot-plants, *Algal Res.* 11 (2015) 248–262.
- [4] N. Betzer, Y. Argaman, Y. Kott, Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation, *Water Res.* 14 (1980) 1003–1009.
- [5] S.B. Velásquez-Orta, R. García-Estrada, I. Monje-Ramírez, A. Harvey, M.T. Orta Ledesma, Microalgae harvesting using ozoflotation: effect on lipid and FAME recoveries, *Biomass Bioenergy* 70 (2014) 356–363.
- [6] O. Komolafe, S.B. Velásquez-Orta, I. Monje-Ramírez, I. Yañez Noguez, A.P. Harvey, M.T. Orta-Ledesma, Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater, *Bioresour. Technol.* 154 (2014) 297–304.

- [7] Y.L. Cheng, Y.C. Juang, G.Y. Liao, P.W. Tsai, S.H. Ho, K.L. Yeh, C.Y. Chen, J.S. Chang, J.C. Liu, W.M. Chen, D.J. Lee, Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 82–87.
- [8] Y.L. Cheng, Y.C. Juang, G.Y. Liao, S.H. Ho, K.L. Yeh, C.Y. Chen, J.S. Chang, J.C. Liu, D.J. Lee, Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 9092–9096.
- [9] B. Langlais, D.A. Reckhow, D.R. Brink, *Ozone in Water Treatment: Application and Engineering*, Lewis, USA, 1991.
- [10] J.F. Zayas, *Functionality of Proteins in Food. Foaming Properties of Proteins*, Springer Verlag, 1996.
- [11] J. Sadowska, B. Johansson, E. Johannessen, R. Friman, L. Broniarz-Press, J. Rosenholm, Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods, *Chem. Phys. Lipids* 151 (2008) 85–91.
- [12] I. Nava Bravo, S.B. Velásquez-Orta, I. Monje-Ramírez and M. Orta-Ledesma, Energy balance of biodiesel production from microalgae harvested from wastewater by ozoflotation, 4th IWA Mexico Young Water Professionals Conference 2015, 27–29 April, ISBN: 978-607-441-404-2, 463–472.
- [13] APHA-AWWA-WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Diaz Santos, Madrid, Spain, 1992.
- [14] C. Birdsall, A. Jenkins, E. Spadinger, Iodometric determination of ozone, *Anal. Chem.* 24 (1952) 662–664.
- [15] A. Pardo-Cervantes, J. Viades-Trejo, J. Gracia-Fadrique, Activity coefficients at infinite dilution and Critical micelle concentrations of Poly(oxy-1,2-ethanediyil), α -Tridecyl- ω -hydroxy ethers (C₁₃Ei=610,18) in aqueous media by the volmer surface equation of state and group contributions, *J. Chem. Eng. Data* 56 (2011) 2812–2817.
- [16] W.D. Harkins, H.F. Jordan, A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring, *J. Am. Chem. Soc.* 52 (1930) 1751–1772.
- [17] C.N. Mulligan, Environmental applications for biosurfactants, *Environ. Pollut.* 133 (2005) 183–198.
- [18] J. Viades-Trejo, J. Gracia-Fadrique, A new surface equation of state: hydrophobic-hydrophilic contributions to the activity coefficient, *Fluid Phase Equilibria* 264 (2008) 12–17.
- [19] C. Safi, M. Charton, A. Ursu, C. Laroche, B. Zebib, P. Pontalier, C. Vaca-Garcia, Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments, *Algal Res.* 3 (2014) 55–60.
- [20] E.A. Foegeding, P. Luck, J. Davis, Factors determining the physical properties of protein foams, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 284–292.
- [21] I.S. Chronakis, A.N. Galatanu, T. Nylander, B. Lindman, The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 173 (2000) 181–192.
- [22] J.V. Moroney, A. Somanchi, How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? *Plant Physiol.* 119 (1999) 9–16.
- [23] R. Chiklahan, N. Chirasuwan, V. Loha, S. Tia, B. Bunnang, Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7159–7164.
- [24] H.N. Cunha, F.L.A.J. Silva, J. Melo, E.H.S. Cavalcanti, T.M. Fonseca, E.U.K. Melcher, A.M.N. Lima, H.M. Laborde, H. Neff, The interaction of ozone with bio-fuel, revealed by electrical conduction and infrared spectroscopy, *Fuel Process. Technol.* 92 (2011) 2160–2168.
- [25] M.N. Vaultier, Y. Jolivet, Ozone sensing and early signaling in plants: an outline from the cloud, *Environ. Exp. Bot.* 114 (2015) 144–152.