

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
UNIDAD DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD
DE INGENIERIA QUIMICA**



INFORME FINAL DE INVESTIGACION

**“CULTIVO DE MICROALGA *Chlorella sp* EN UN
FOTOBIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE BODIESEL”**

SONIA ELIZABETH HERRERA SANCHEZ

PERÍODO DE EJECUCIÓN: Del 04 de Marzo del 2019 al 29 de Febrero del 2020

Resolución Rectoral N° 371-2019-R

Callao, 2020

DEDICATORIA

A mis padres que están en el cielo y a mis hermanos por su amor y comprensión

Al Ing. Adalides Arenas por sus conocimientos impartidos en el presente trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a la Facultad Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao por facilitarme el uso de los materiales, equipos y las instalaciones del laboratorio de Química y microbiología

INDICE

	Pág.
INDICE DE TABLA	4
INDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
CAPITULO I:PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.1 Descripción de la realidad problemática	10
1.2 Formulación del problema	11
1.2.1 Problema general	11
1.2.2 Problema específico	11
1.3 Objetivos	11
1.3.1 Objetivo general	11
1.3.2 Objetivo específico	11
1.4 Limitaciones de la investigación	11
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	13
2.1 Antecedentes	13
2.1.1 Antecedentes internacionales	13
2.1.2 Antecedentes nacionales	17
2.2 Marco	19
2.2.1 Marco teórico	19
2.2.2 Marco conceptual	33
2.3 Definición de términos básicos	37
CAPITULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	39
3.1 Hipótesis	39
3.1.1. Hipótesis general	39
3.1.2 Hipótesis específica	39
3.2 Definición conceptual de variables	39
3.3 Operacionalización de variables	39

CAPITULO IV: DISEÑO METODOLÓGICO	40
4.1 Tipo y diseño de la investigación	40
4.2 Método de investigación	40
4.3 Población y muestra	40
4.4 Lugar de estudio y periodo de desarrollo	41
4.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de la información	41
4.6 Análisis y procesamiento de datos	43
4.6.1 Método de análisis	43
4.6.2 Metodología experimental	43
4.6.3 Diseño experimental	44
4.6.4 Formulación de los nutrientes para el cultivo de microalgas	45
4.6.5 Implementación de los fotobiorreactores	46
4.6.6 Curva de crecimiento	47
4.6.7 Tasa de crecimiento	47
4.6.8 Producción de biomasa	49
4.6.9 Extracción de lípidos	54
4.6.10 Reacción de transesterificación	55
4.6.11 Determinación del rendimiento del Biodiesel	57
4.6.12 Análisis por espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier	57
CAPITULO V: RESULTADOS	59
5.1 Resultados descriptivos	59
5.1.1 Medio de cultivo	59
5.1.2 Crecimiento algar	59
5.1.3 Producción de biomasa	61
5.1.4 Extracción y análisis de lípidos	63
5.1.5 Rendimiento del Biodiesel (Rb)	64
5.1.6 Resultado de espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier	64
5.2 Resultados inferenciales	65
5.3 Resultados estadísticos de acuerdo al problema y la hipótesis	66

CAPITULO VI: DISCUSION DE RESULTADOS	67
6.1 Contratación y demostración de la hipótesis con los resultados	67
6.2 Contratación de los resultados con otros estudios similares	67
6.3 Responsabilidad ética	69
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	79
Matriz de Consistencia	79

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación de microalgas	21
Tabla 2 Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel en México	23
Tabla 3 Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas.	26
Tabla 4 Medio Basal de Bold (BBM)	45
Tabla 5 Soluciones de Microelementos	46
Tabla 6 Solución 1	46
Tabla 7 Solución 2	46
Tabla 8 Características físicas que se controlaron durante el crecimiento de las microalgas	60
Tabla 9 Lectura del Crecimiento ($\text{celx}10^6 \text{ mL}$) <i>Chlorella sp</i>	60
Tabla 10 Biomasa seca de microalga <i>chlorella sp</i>	62
Tabla 11 Lípidos obtenidos de biomasa seca microalga <i>chlorella sp</i>	63

INDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Biosíntesis de lípidos microalgales	29
Figura 2	Proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas	30
Figura 3	Proceso general de producción de biodiesel a partir de algas a pequeña escala	32
Figura 4	Reacción general de transesterificación. R1, R2, R3 y R' son radicales alquilo	33
Figura 5	Morfología de la <i>Chlorella sp</i>	35
Figura 6	Biorreactor tanque agitado, bajo condiciones de laboratorio	36
Figura 7	Proceso de producción de energía usando biomasa microalgar	37
Figura 8	Procedimiento experimental realizada en tres etapas	44
Figura 9	Acondicionamiento de las microalgas en fotobiorreactores	47
Figura 10	Cultivo de microalgas	48
Figura 11	Observación microscopio células individuales	48
Figura 12	Centrifuga refrigerada	49
Figura 13	Frascos de capacidad de 25 y 50 mL de biomasa centrifugados	49
Figura 14	Biomasa concentrada	53
Figura 15	Secado de la biomasa	53
Figura 16	Proceso de obtención del lípido mediante Soxhlet	54
Figura 17	Reacción de transesterificación para la obtención del biodiesel	55
Figura 18	Proceso de separación del biodiesel de los demás componentes	56
Figura 19	Proceso de separación del biodiesel de los demás componentes	57

INDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 20	Equipo FTIR modelo 8400S con PC incorporada	58
Figura 21	Crecimiento de <i>Chlorella sp</i> en Fotobiorreactor acondicionados con inyección de CO ₂	59
Figura 22	Crecimiento (celx10 ⁶ mL) <i>Chlorella sp</i> evaluada durante la fase exponencial (52 días)	61
Figura 23	Muestra de Biomasa seca de microalgas <i>chorella sp</i>	62
Figura 24	Biomasa en base seca de microalgas <i>chlorella sp</i>	63
Figura 25	Lípidos totales obtenidos de biomasa seca	64
Figura 26	Espectro de transmisión FTIR (línea roja) muestra patrón y línea verde es la muestra de biodiesel	65

RESUMEN

En el presente trabajo se ha determinado las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga *Chlorella sp* en fotobiorreactor para la obtención del biodiesel.

Experimentalmente se determinaron las condiciones para el cultivo de las microalgas *chorella sp* en fotobiorreactor, usando medio de cultivo basal de Bold (BBM) como el más adecuado para el desarrollo y producción de biomasa de microalgas, controlando el flujo de CO₂, pH, T °C, el crecimiento algal se midió mediante cámara de Neubauer hasta un tiempo de 52 días, para la obtención de la biomasa se centrifugo en equipo modelo BKC-TH16/18 luego se realizó la extracción del lípido por el método Soxhlet y finalmente se realizó la reacción de transesterificación para la obtención del biodiesel.

Los resultados de las características físicas y químicas para la producción de biomasa fueron: pH 8,3; Temperatura: 19,4 °C; Flujo de CO₂: 0,25 L/min, crecimiento algal 75,7 x10⁶ cel/mL representado en peso promedio de 0,77 g/L de biomasa de donde se obtuvo un promedio de 11,67 g/L de lípidos, con un rendimiento de 57,17% de biodiesel.

Se concluye que al aplicar condiciones apropiadas en el cultivo de las microalgas *chorella sp* se obtiene biodiesel.

Palabras clave: microalgas, *chlorella sp*, biomasa, biodiesel, fotobiorreactor.

ABSTRACT

In the present work, the appropriate conditions for the cultivation of the *Chlorella sp* microalgae in a photobioreactor for obtaining biodiesel have been determined.

Experimentally, the conditions for the cultivation of the *chorella sp* microalgae in a photobioreactor were determined, using Bold's basal culture medium (BBM) as the most suitable for the development and production of microalgae biomass, controlling the flow of CO₂, pH, T ° C, algal growth was measured by Neubauer chamber up to a time of 52 days, to obtain the biomass, it was centrifuged in model BKC-TH16 / 18 equipment, then the lipid extraction was performed by the Soxhlet method and finally the transesterification reaction to obtain biodiesel.

The results of the physical and chemical characteristics for biomass production were: pH 8,3; Temperature: 19,4 ° C; CO₂ flow: 0,25 L / min, algal growth 75,7 x10⁶ cel / mL represented in average weight of 0,77 g / L of biomass from which an average of 11.67 g / L of lipids was obtained, with a yield of 57,17% of biodiesel.

It is concluded that by applying appropriate conditions in the cultivation of the *chorella sp* microalgae, biodiesel is obtained

Key Word: microalgae, *chlorella sp*, biomass, biodiesel, photobioreactor

INTRODUCCIÓN

Actualmente se tiene problemas de contaminación ambiental por el uso de los combustibles fósiles, debido al incremento de la demanda y por las facilidades que se tiene de obtener un vehículo esto genera emisiones contaminantes al medio ambiente provenientes del parque automotor. Por lo que debemos tener en cuenta el cuidado del medio ambiente y reemplazar estos combustibles fósiles por un alternativo como el biodiesel que se obtiene de los lípidos provenientes de la microalga *Chlorella sp* por el método de transesterificación.

En el presente trabajo de investigación se tuvo como objetivo determinar las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga *Chlorella sp* en Fotobiorreactor y la obtención de la biomasa de *chlorella sp* para el biodiesel

Para ello se controlaron las propiedades físicas como el pH, temperatura, el flujo de CO₂ y químicas como el uso de los micronutrientes y macronutrientes en el medio de crecimiento de microalga *Chlorella sp* para obtener la biomasa, como las operaciones de centrifugar, secarlo en estufa a temperatura controlada, extracción de los lípidos por el método soxhlet utilizando un solvente como el éter de petróleo y luego se determinó el rendimiento de lípido, finalmente se realizó la reacción de síntesis de transesterificación con metanol y KOH obteniendo como resultado el biodiesel y glicerina este producto fue analizado por espectrofotometría de infrarrojo (FTIR) que permitió identificar la composición del biodiesel como el oleato de metilo en mayor proporción y otros en pequeñas cantidades.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

El presente estudio corresponde al de procesos microbianos.

Para el cultivo de microalgas se requiere acondicionar factores que permitan rápidamente su desarrollo y que la recolección no presente dificultades por lo que se ha estudiado los factores principales que influyen en el crecimiento y la producción de la mayor cantidad de biomasa.

También se ha considerado como influencia las características del fotobiorreactor en lo referente en el suministro de aire o CO₂ y la sencillez para realizar las mediciones de crecimiento celular. Por otra parte el consumo de los combustibles fósiles presenta el problema de contaminación del medio ambiente por la abundante producción de gases de efecto invernaderos y la tendencia de escasez de petróleo. Problemas que se han considerado en la producción de *chlorella sp*, por la considerable proporción de lípidos que produce en sus procesos metabólicos y de la biomasa residual que puede y usarse también como combustible. En el estudio se ha tenido en cuenta la utilización de los lípidos en la producción de biocombustibles mediante el proceso de transesterificación, con metanol, y el hidróxido de potasio como catalizador.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuáles son las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga *Chlorella sp* en Fotobiorreactor para la obtención del biodiesel

1.2.2 Problema específico

- ¿Qué características físico químicas tiene el medio de crecimiento?
- ¿Cuál será el rendimiento en la producción de lípido y la producción de biodiesel?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga *Chlorella sp* en Fotobiorreactor para la obtención del biodiesel

1.3.2 Objetivo específico

- Analizar las características físico químicas del medio de crecimiento de la microalga *Chlorella sp*
- Determinar el rendimiento de lípido y la producción de biodiesel

1.4 Limitaciones de la investigación

- Teórica

Actualmente se presentan ciertas limitantes porque hay que desarrollar la metodología del cultivo de la microalga *chlorella sp*.

- **Temporal**

La presente investigación desarrollada es de tipo experimental, y se ha planificado su ejecución en un periodo de doce meses que no se cumplió porque se tuvo algunos inconvenientes en el proceso de centrifugación para obtener la biomasa.

- **Espacial**

La presente investigación pertenece al área de biotecnología debido a que propone alternativas de tecnología limpia como lo es el biodiesel.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes Internacionales

Khan *et al.* (2017) estudiaron que el uso de las fuentes de energía ha alcanzado el nivel en el que todo el mundo confía en él. Siendo la mayor Fuente de energía, los combustibles son considerados los más importantes. La sed hacia la producción de biocombustibles ha aumentado durante las últimas décadas. Teniendo en cuenta los problemas alimentarios, Las algas obtienen la mayor atención para ser utilizadas como productores de biocombustibles.

Diferentes tipos de algas que tienen las diferentes capacidades de producción. Normalmente las algas tienen contenido de aceites entre 20% y 80% que podrían convertirse en combustibles.

La producción de diesel a partir de algas es económica y fácil. Hay diferentes especies tales como *tribonema*, *ulotrix* y la *euglena* tiene un buen potencial para la producción de biodiesel.

Nuñez E.; Angulo G. Cadena L. (2017) estudiaron que las patentes relacionadas con la producción de biodiesel tienen fuerte tendencia a tecnologías que tienen que ver con técnicas y métodos relacionados con la mutación genética y cultivo de microorganismos; Procedimientos para la obtención de compuestos químicos por medio de microorganismos o enzimas; Sistemas y métodos para la mejora del proceso de producción de biodiesel; Tratamientos de materias primas oleaginosas.

Cobos *et al.* (2016) Evaluaron la producción de lípidos totales en cinco especies de microalgas inducidas por la ausencia de nitrógeno. Las microalgas empleadas fueron *Ankistrodesmus sp.*, *Ankistrodesmus nannoselene*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda*. Estas especies fueron cultivadas en medio CHU10 con y sin nitrógeno. El tiempo de evaluación fue de seis días, determinándose diariamente la densidad microalgal mediante recuento en cámara de Neubauer. Se determinó la tasa de crecimiento, la biomasa microalgal y el porcentaje de lípidos totales. Los lípidos totales fueron extraídos con solución Cloroformo:metanol (2:1). Los resultados indicaron que las especies con mayor producción de lípidos totales fueron *Ankistrodesmus sp.* (263,6 mg/g biomasa seca), *A. nannoselene* (316 mg/g biomasa seca) y *Scenedesmus sp.* (243,3 mg/g biomasa seca) al ser cultivadas en medios sin nitrógeno. *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sp.*, fueron las especies que mostraron mayor producción de biomasa seca (159,1 mg/g biomasa seca y 221,1 mg/g biomasa seca respectivamente) en medios con nitrógeno. La tasa de crecimiento fue variable entre las especies cultivadas en ambas condiciones. En conclusión, *Ankistrodesmus sp.*, mostró la mayor tasa de crecimiento (0,77 día⁻¹) en medio sin nitrógeno. Bajo las mismas condiciones de cultivo, *Scenedesmus sp.* obtuvo la mayor producción de biomasa en peso seco (174,7 mg/L) y *Ankistrodesmus nannoselene* acumuló el mayor porcentaje de lípidos totales.

Tejeda-Benitez *et.al* (2015) investigaron el cultivo de las microalgas *Chlorella sp.* y *Dunaliella salina* bajo diferentes condiciones de pH y concentración de nitrógeno (mg/L), y la caracterización de los aceites obtenidos, con el fin de evaluar su potencial uso como materia prima en la producción de biodiésel.

La *Dunaliella. salina* alcanzó una máxima concentración celular de 1.15×10^6 células mL⁻¹ en 6 días de cultivo en unas condiciones de 8.5

pH y 0.1 mg/L concentración de nitrógeno, mientras que *Chlorella sp.* presentó una máxima concentración celular de 2.6×10^7 células mL⁻¹ en 14 días de cultivo en unas condiciones de 7,5 pH y 0,1 mg/L concentración de nitrógeno.

Al determinar el perfil de ácidos grasos de los aceites extraídos de ambas microalgas, se encontraron en mayor proporción dos ácidos grasos insaturados: ácido linolénico y ácido oleico. En el aceite de *D. salina* se encontró una concentración de 51% p/p de ácido linolénico, mientras que para el aceite de *Chlorella sp.* fue de 39% p/p. Con relación al ácido oleico, el aceite de *Chlorella sp.* presentó una concentración de 35% p/p, superior al aceite de *D. salina*, con 25% p/p.

Garibay-Hernández *et al.* (2009) investigaron que el uso de las microalgas para la obtención de biodiesel es una alternativa debido al contenido de lípidos. Las características de las microalgas tienen elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta.

Avila F. (2015) determinó que la transesterificación de ácidos grasos ha sido el método comúnmente empleado en la modificación de aceites vegetales para su implementación como biodiesel en motores de combustión interna. Las variables que intervienen en la reacción de transesterificación para la obtención del biodiesel son: tipo de materia prima, alcohol, catalizador y concentración del mismo, entre otras. Las propiedades y la calidad del biodiesel no sólo están determinadas por las variables del proceso de producción sino también por la composición de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAAE) que lo componen.

Las muestras de biodiesel B100 (libre de aditivos) fueron producidas a partir de distintas materias primas como aceite de girasol, maíz, soja y

uva. Se optimizó el proceso de producción catalizado por una base y empleando metanol. La calidad de las muestras de biodiesel obtenidas en el laboratorio fue evaluada según la norma argentina IRAM 6515-1:2006. Además, se desarrolló un método espectrométrico UV-VIS para la determinación de la estabilidad oxidativa del biodiesel mediante la oxidación acelerada de los FFAE asistida por ultrasonidos.

Los valores de tiempo de inducción determinados mediante el método propuesto para todas las muestras de biodiesel, estuvieron en concordancia con los valores medidos a través del método de referencia Rancimat. Además, se propuso el desarrollo de un método simple y rápido para la determinación del contenido de Na, K, Ca, Mg, P y 20 metales pesados en muestras de biodiesel, mediante espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES), usando un multinebulizador Flow Blurring prototipo de dos boquillas y la calibración online por estándar interno. El análisis de las muestras fue realizado sin necesidad de emplear ningún tipo de pretratamiento. La precisión a corto y largo plazo fue estimada a través de la desviación estándar relativa, las mismas fueron aceptables. Los porcentajes de recuperación para los componentes mayoritarios (Na, K, Ca, Mg y P) estuvieron entre un 95% y un 106%.

Ruoyu, X ; Yongli, M (2011), Los biocombustibles a base de cultivos, incluido el biodiesel, han suscitado preocupaciones internacionales durante los últimos años. Las microalgas han sido fuertemente recomendadas como el sustituto más prometedor para los cultivos oleaginosos. Sin embargo, la comercialización de biodiésel de microalgas se ve obstaculizada por los altos costos de la materia prima y los procesos de producción convencionales. Este documento aclara un proceso de producción simplificado y escalable en condiciones de menor demanda energética, que integra la extracción y conversión de petróleo en un solo paso a través de la transesterificación in situ.

Introducir un codisolvente es la clave del éxito. Se proponen criterios para codisolventes aplicables a la industria del biodiésel de microalgas. El rendimiento global de biodiésel (OBY) de la espirulina se determinó con fines de evaluación comparativa, utilizando el protocolo Bligh y Dyer para la extracción de petróleo y la transesterificación con hidróxido de potasio. OBY evaluó el rendimiento en la transesterificación in situ de los codisolventes seleccionados tolueno, diclorometano y éter dietílico, así como las combinaciones de solventes éter de petróleo / tolueno, tolueno/metanol y diclorometano/metanol. Entre todos los codisolventes probados, el sistema de tolueno / metanol, relación 2:1 en volumen, demostró la mayor eficiencia, logrando un rendimiento de biodiesel del 76% del OBY para el primer ciclo de transesterificación in situ y del 10% para el segundo ciclo de transesterificación in situ.

2.1.2 Antecedentes Nacionales

Ynga G (2013). El cultivo masivo de microalgas en biorreactores presenta una alta tasa de productividad frente a los cultivos abiertos, esta ventaja, aunada a determinados factores ambientales, se relaciona directamente con la cantidad y calidad de biomasa algal obtenida como producto final en el proceso de cultivo. El presente trabajo centró sus investigaciones en la evaluación de los parámetros físicos del ambiente (temperatura e intensidad lumínica), así como, físico-químicos (temperatura, pH y CO₂) en la capacidad de carga de los cultivos. La investigación se desarrolló en el invernadero del Área de Biotecnología Acuática, del Instituto del Mar del Perú, dentro del marco del Proyecto IMARPE-EEP-FINCYT, denominado “Determinación de la Biomasa Microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustibles”, según contrato N°025-FINCYT-PIBAP-2007. Los cultivos se realizaron empleando la cepa IMP-LBA-009, correspondiente a la microalga *Nannochloropsis* spp., con un flujo de producción semi-

continuo por 48 horas, en un periodo de 6 meses, entre julio a diciembre, Bajo condiciones de iluminación ($22,003.93 \text{ Lux.m-2.seg}^{-1} \pm 10640.94$), temperatura ambiental ($31.7^{\circ}\text{C} \pm 2.8$), temperatura de cultivo ($25.7^{\circ}\text{C} \pm 1.2$), CO_2 (0.2 g.L^{-1}) y pH (8.36 ± 0.18); los resultados mostraron que la producción de biomasa húmeda fue 0.48 g.L^{-1} , equivalente a 0.13 g.L^{-1} de biomasa seca, durante los meses de octubre y noviembre, con una razón de conversión BS/BH del 28%. El impacto lumino-térmico, al interior del invernadero, favoreció el incremento progresivo de la concentración celular del cultivo en biorreactores, por ende, la producción de biomasa húmeda y seca, durante el periodo de trabajo.

Gonzales J, Terán A. (2013), estudiaron microorganismos con alto contenido oleaginoso, tal es el caso de las algas que, además de presentar un alto índice de crecimiento, son organismos fotosintéticos capaces de capturar y almacenar CO_2 atmosférico y, por tanto, disminuir el efecto invernadero causado por este gas en el ambiente.

En tal sentido, es de interés particular el alga de agua dulce *Scenedesmus spp.* que se cultivó en soluciones con diferente concentración de Nitrofoska Verde resultando óptima la trabajada al 0,01%.

La biomasa húmeda y seca fue del orden de 3.81252 g/L y 0.165 g/L respectivamente, esta última se constituyó como materia prima para obtener aceite siguiendo la metodología de Soxhlet, lográndose un rendimiento de 6.323%. Como consecuencia de lo anterior, se procedió a las reacciones de transesterificación con metanol como sustancia reactiva e hidróxido de sodio como catalizador, a una temperatura de 60°C , tiempo de reacción de 90 minutos y agitación constante de 200 rpm. El rendimiento de biodiesel a partir del aceite de *Scenedesmus spp* fue de 85,034%.

2.2 Marco

2.2.1 Marco teórico

Las microalgas

Richmond A. (2004). En ficología aplicada y biotecnología, el termino microalgas define a organismos microscopicos, con clorofila a, que realizan fotosíntesis oxigenica y sin diferenciación en raíces, tallo y hojas. Incluyen tanto a microorganismos eucariotas (clasificados tradicionalmente segun sus pigmentos fotosinteticos en rodofitas, clorofitas, dinofitas, crisofitas, prymnesiofitas, bacillariofitas, xantofitas, eustigmatofitas, raphidofitas y feofitas) como a procariotas (cianobacterias y proclorofitas) distribuidos por todos los hábitats terrestres y acuáticos.

Estos microorganismos fueron los responsables del cambio en la composición de la atmosfera primitiva hace unos 3500 millones de años, aumentando el nivel de oxígeno, originando una atmosfera rica en este gas, que ha permitido el desarrollo de la vida tal como la conocemos (Demirbas y Demirbas, 2010). Son responsables de al menos la mitad de la productividad primaria planeta.

Características generales de las microalgas

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000, de las cuales con frecuencia se desconoce su

composición bioquímica y metabolismo las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular Tabla 1.

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico. El interés por las microalgas surgió en Alemania en los años cincuenta y sesenta al ser consideradas como una fuente abundante de proteína de bajo costo para la nutrición humana, interés que después se extendió a países de todos los continentes.

El atractivo de las microalgas posteriormente fue encausado hacia otras aplicaciones tales como la acuicultura (cultivo de especies acuáticas vegetales y animales en medios naturales y artificiales), el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas finas, la producción de farmacéuticos y los procesos de bioconversión energética. La producción de bioenergía a partir de microalgas fue contemplada desde los años cincuenta, sin embargo a partir de la crisis energética de 1975, el potencial económico de esta tecnología fue reconocido por varios países como EUA, Japón y Australia (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Huntley & Redalje, 2007).

Tabla 1

Clasificación de las microalgas. Se describen las principales divisiones en las cuales las microalgas han sido clasificadas de acuerdo a parámetros diversos tales como pigmentación, ciclo de vida, estructura celular, etc.

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

Fuente: Hu et al (2008); Sheehan et al. (1998)

Características relevantes de los cultivos de microalgas para la producción de biodiesel

Garibay-Hernández *et al.* (2009) en la actualidad se ha detectado el uso de lípidos microalgales para la producción de biodiesel, ya que es una alternativa que asegura satisfacer o reemplazar la demanda global de petrodiesel. Esta tecnología es prometedora dadas las ventajas que

ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética; eficacia superior en la asimilación de nutrientes; y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación de las microalgas. Los cultivos microalgales son independientes de la estacionalidad inherente a los cultivos agrícolas y de la fertilidad del suelo, condición que posibilita prescindir de herbicidas y pesticidas y además, permite emplear territorios marginales e inclusive zonas no aptas para la agricultura, ganadería, industria y turismo.

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Asimismo, en contraste con los cultivos tradicionales, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta, por lo que prosperan convenientemente tanto en aguas marinas, como dulces, salobres y residuales.

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Igualmente, el contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes. Además esta tecnología puede ser acoplada al reciclaje del CO₂ liberado en las emisiones industriales, especialmente por las plantas de producción de electricidad a partir de combustibles fósiles. Una ventaja adicional estriba en la posibilidad de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal residual una vez que los lípidos han sido extraídos. Inclusive, resulta factible el empleo de algunos de estos residuos en la alimentación humana o animal y en la producción de fertilizantes o de otros biocombustibles. Finalmente, la ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas

(Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2007; Williams, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Rittmann, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Waltz, 2009).

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Una de las estimaciones más conservadoras para el rendimiento anual de biodiesel microalgal, como se indica en la Tabla 2, por lo menos duplica los rendimientos obtenidos a partir de plantas oleaginosas.

Tabla 2

*Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel en México. Se indican las proporciones de suelo fértil y de superficie total del país necesarias para reemplazar con biodiesel el 100% de la demanda de petrodiesel en México (CIA World Factbook, 2009; Schenk *et al.* 2008)*

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

Fuente: ^a Rendimiento conservador de productividad de biodiesel microalgal acorde con Schenk *et al.* (2008).

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

El contenido lipídico de las microalgas

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia

metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008).

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

Los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las microalgas oleaginosas son diversos. En los ejemplares eucariontes, el contenido lipídico es considerado como propio de la especie y no del género, de manera tal que este parámetro varía notablemente entre las especies individuales de cada grupo taxonómico (Ben-Amotz *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2008). No obstante, de acuerdo con Hu *et al.* (2008), es posible generalizar que microalgas oleaginosas eucariontes de grupos diversos (clorofitas, diatomeas, crisofitas, haptofitas, eustigmatofitas, dinofitas, xantofitas y rodofitas) presentan, bajo condiciones normales de cultivo, una fracción lipídica promedio del 25.1%, magnitud que es superior (45%) en situaciones de estrés.

Cabe destacar que la ubicuidad de las algas verdes (clorofitas) en hábitats diversos, además de la facilidad para su aislamiento y desarrollo en condiciones de laboratorio, ha favorecido la identificación de numerosas especies oleaginosas en este grupo, condición que no

necesariamente es distintiva del mismo. Las cianobacterias por su parte presentan bajos contenidos lipídicos promedio (9.8%; Hu *et al.*, 2008), sin embargo su aplicación en la producción de biodiesel ha sido sugerida por Rittmann (2008) a causa de la producción de lípidos paralela al crecimiento y la sencillez para la manipulación genética que ofrecen, en contraste con las especies eucariontes. Químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad

Las estructuras de estas biomoléculas comprenden largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente). En las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, etc.), aunque compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, alquenonas de cadena larga, entre otros

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

Especie	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso-seco x 100)	Especie	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso-seco x 100)
<i>Ankistrodesmus</i> sp. ^{2,4,5}	24.5 – 40.3	<i>Hormotilopsis gelatinosa</i> ²	49.1
<i>Botryococcus braunii</i> var. A ^{2,5}	43.0 – 63.0	<i>Isochrysis</i> sp. ^{4,8}	7.1 – 47.0
<i>Botryococcus braunii</i> var. B ^{2,5}	53.0 – 86.0	<i>Monallantus salina</i> ^{1,2}	20.0 – 72.2
<i>Botryococcus sudeticus</i> ⁷	9.39 – 23.09	<i>Monodus subterraneus</i> ^{2,10}	39.3 – 40.0
<i>Chaetoceros gracilis</i> ²	46.0	<i>Nannochloris</i> sp. ^{1,8}	20.0 – 47.8
<i>Characium polymorphum</i> ²	42.0	<i>Nannochloropsis salina</i> ⁸	40.8 – 72.2
<i>Chlamydomonas appplanata</i> ²	32.8	<i>Nannochloropsis</i> sp. ^{1,9}	28.7 – 68.0
<i>Chlorella emersonii</i> ^{9,10}	63.0	<i>Naviculla pelliculosa</i> ^{2,6}	22.0 – 44.8
<i>Chlorella minutissima</i> ^{9,10}	57.0	<i>Neochloris oleoabundans</i> ^{2,3}	18.9 – 88.8
<i>Chlorella protothecoides</i> ¹⁰	23.0	<i>Nitzschia laevis</i> ¹⁰	69.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ^{2,8}	14.4 – 35.8	<i>Nitzschia pelea</i> Kutz ^{2,8}	27.2 – 39.5
<i>Chlorella sorokiana</i> ^{9,10}	22.0	<i>Nitzschia</i> sp. ^{1,4}	22.1 – 47.0
<i>Chlorella</i> sp. ¹	28.0 – 32.0	<i>Ochromonas danica</i> ^{2,8}	39.0 – 71.0
<i>Chlorella vulgaris</i> ⁹	5.1 – 56.0	<i>Oocystis polymorpha</i> ²	34.7
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> ²	44.3	<i>Parietochloris incisa</i> ¹⁰	62.0
<i>Chlorosarcinopsis nagevensis</i> ²	32.2	<i>Ourococcus</i> sp. ^{2,8}	27.0 – 49.5
<i>Chroomonas salina</i> ⁸	44.0	<i>Peridinium cinetum</i> fa. Westi ²	36.0
<i>Chrysochromulina kappa</i> ^{2,8}	32.6	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ²	31.0
<i>Chrysochromulina polylepsis</i> ^{2,8}	47.6	<i>Protosiphon botryoides</i> ^{2,8}	37.0
<i>Cosmarium laeve</i> ^{2,8}	15.0 – 33.0	<i>Prymnesium parvm</i> ^{2,8}	22.0 – 38.2
<i>Cryptocodinium cohnii</i> ¹	20.0	<i>Radiosphaera nagevensis</i> ^{2,8}	43.0
<i>Cyclotella cryptica</i> ²	36.8	<i>Scenedesmus dimorphus</i> ^{2,8,9}	6.0 – 40.0
<i>Cyclotella</i> sp. ²	54.0	<i>Scenedesmus obliquus</i> ⁹	11.0 – 55.0
<i>Cylindrotheca</i> sp. ¹	16.0 – 37.0	<i>Scotiella</i> sp. ^{2,8}	34.5 – 48.0
<i>Dunaliella primolecta</i> ^{1,2,8}	23.0 – 53.8	<i>Schizochytrium</i> sp. ¹	50.0 – 77.0
<i>Dunaliella salina</i> ^{2,4,8}	9.2 – 47.2	<i>Skeletonema costatum</i> ²	30.3
<i>Euglena gracilis</i> ²	55.0	<i>Stichoccus bacillaris</i> ²	38.9
<i>Hantzchia</i> sp. ²	61.0	<i>Tetraselmis sueica</i> ¹	15.0 – 23.0

Fuente:

¹Chisti, 2007; ²Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; ³Gatenby *et al.*, 2003; ⁴Ben-Amotz *et al.*, 1985;

⁵Metzger & Largeau, 2005; ⁶Sheehan *et al.*, 1998; ⁷Vázquez-Duhalt & Greppin, 1987; ⁸Cohen, 1986; ⁹Gouveia & Oliveira, 2009; ¹⁰Li *et al.*, 2008.

Síntesis de lípidos

Vélez T. (2012), La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies. Por lo general, en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción compuestos poli-insaturados (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids). Estos últimos, ocasionalmente constituyen la mayor fracción de ácidos grasos en especies marinas. La variación del perfil de ácidos grasos entre grupos algales diversos es considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo (Cohen, 1986; Hu *et al.*, 2008; Griffiths & Harrison, 2009).

Condiciones Ambientales que afectan la acumulación de lípidos.

Garibay-Hernández *et al.* (2009), Determinaron que la producción de lípidos al igual que su composición en las microalgas, a pesar de depender principalmente de la especie, y en última instancia de su constitución genética, son afectados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, tales como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad, el tipo, periodos e intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos. Garibay-Hernández *et al.* (2009) La aclimatación de las microalgas a la restricción de nutrientes se caracteriza por la manifestación de respuestas específicas para el elemento limitado (inducción de sistemas de transporte de alta afinidad y de la síntesis de enzimas hidrolíticas para la liberación intra- o extracelular del nutriente), además de respuestas generales tales como cambios morfológicos,

cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos. La limitación de Nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación. Respuestas similares son inducidas por la deficiencia de fósforo, azufre y silicio, siendo el efecto de este último específico para las diatomeas.

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Asimismo, la disponibilidad de Hierro ($^{+3}$) influye en el contenido oleaginoso, aunque el mecanismo se desconoce. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la restricción de nutrientes es considerablemente variable y por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies microalgales (Ben-Amotz, *et al.*, 1985; Cohen, 1986; Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Thompson, 1996; Sheehan *et al.*, 1998; Grossman & Takahashi, 2001; Gatenby *et al.*, 2003; Guschina & Harwood, 2006; Huntley & Redalje, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009).

Garibay-Hernández *et al.* (2009) La temperatura, por su parte, afecta notablemente el perfil lipídico de las microalgas, de manera tal que a bajas temperaturas incrementa el grado de insaturación. Las altas intensidades luminosas son otra de las condiciones que favorecen sustancialmente la acumulación de triglicéridos con un elevado perfil de saturación, donde intensidades bajas a su vez promueven la síntesis de lípidos polares altamente insaturados, estructural y funcionalmente asociados con las membranas. El pH y la salinidad son otros factores que modifican la síntesis de lípidos de diversas microalgas, sin embargo el tipo y cantidad de lípidos producidos también dependen de la especie

y de la magnitud del cambio de éstas variables (Cohen, 1986; Arredondo & Vázquez-Duhalh, 1991; Thompson, 1996; Andersen, 2005; Guschina & Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009

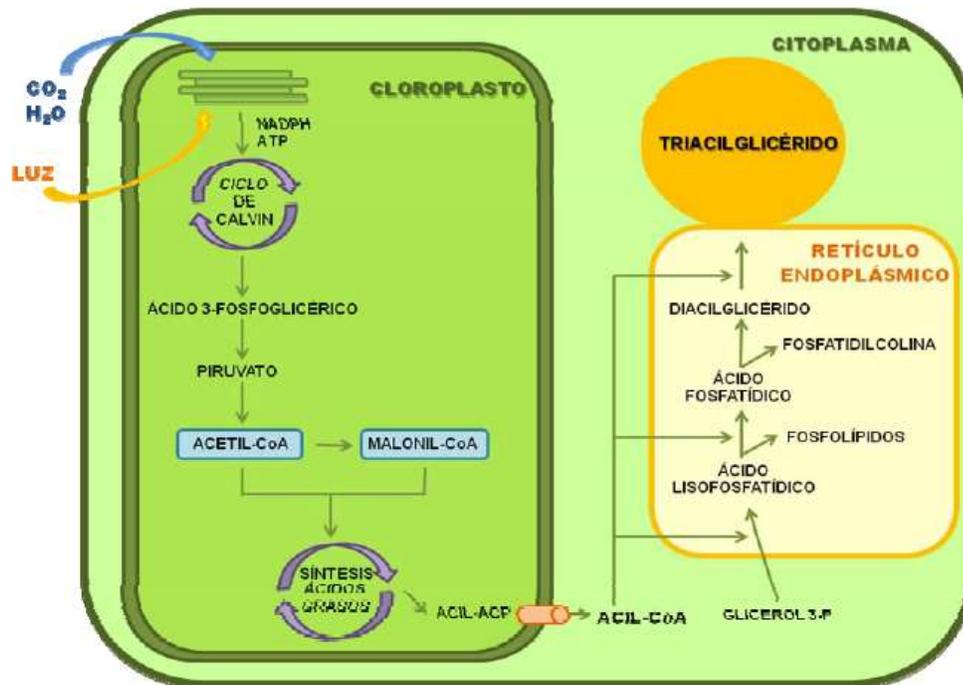


Figura 1. Biosíntesis de lípidos microalgales.

Fuente: (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2009).

Producción de Microalgas

Garibay-Hernández *et al.* (2009) estudiaron la producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado, en términos generales, por las etapas elementales de producción de biomasa rica en lípidos, recuperación o cosecha de la biomasa, extracción de lípidos y transesterificación, como se indica en la siguiente figura.

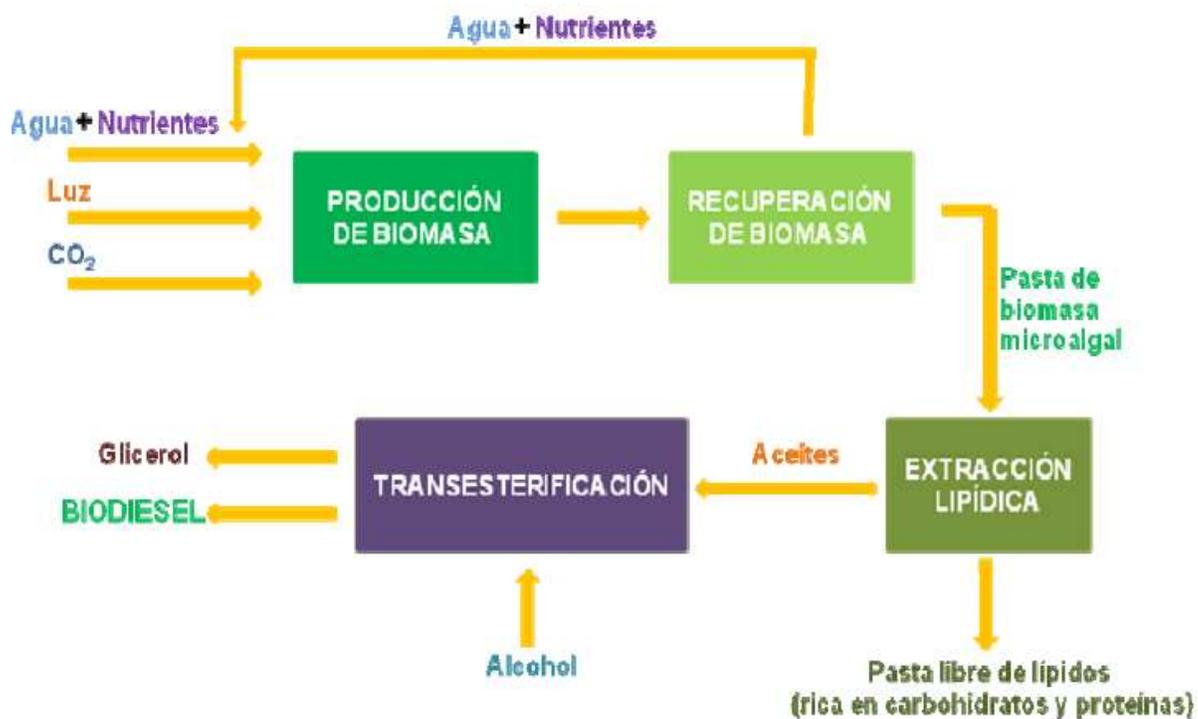


Figura 2. Proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas.

Fuente: (Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008)

Garibay-Hernández *et al.* (2009) En relación a la etapa de producción de biomasa de microalgas, actualmente existen sistemas de cultivo de microalgas destinados a la obtención de productos de alto valor agregado (pigmentos carotenoides, ácidos grasos esenciales - $\omega 3$ y $\omega 6$ -, compuestos isotópicos, ficobiliproteínas, farmacéuticos - anticancerígenos y antibióticos -, vitaminas C y E, etc.), no obstante ante la escasa flexibilidad económica del mercado de los biocombustibles, la optimización de tales sistemas de producción resulta necesaria (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Schenk *et al.*, 2008; Wijffels, 2008). Los sistemas empleados con mayor frecuencia en la producción de biomasa microalgal son los de tipo abierto, que a pesar de sus formas y tamaños diversos, destacan por asemejar el entorno natural de las microalgas

Los procesos para la producción de biocombustibles usando algas

(Khan, 2017) las algas tienen contenidos de aceite con diferentes composiciones dependiendo de los tipos de especies. Se identificaron algunas especies que tienen buenos valores de ácidos grasos.

De la misma manera Richmond (2004), algunas algas tienen más componentes de los ácidos grasos por sus masas secas. Las microalgas pueden crecer en diferentes condiciones incluso en disponibilidad de menos nutrientes.

El método simple de extracción de ácidos grasos y separación del biodiesel es el método de mezcla a pequeña escala o experimental. Este proceso consta de varios pasos que se han mostrado en Figura 4.

También es necesario conocer la unidad de cultivo de algas. cultivo, si es bueno elegir el sistema cerrado o abierto. Se confirma el proceso ya sea por lotes o continuo. Dependiendo de las condiciones e instalaciones, incluyendo pH, temperatura, Tipo de especie de algas y la cantidad de biomasa de algas

Las técnicas de recolección sugeridas se basan en el estanque de sedimentación o Tanque de sedimentación. Se requiere ajuste de densidad y humedad durante todo el proceso de producción de biodiesel.

La técnica más utilizada es el secado de algas por aspersión, el secado en tambor también fue sugerido. El proceso de interrupción a través de manejos mecánicos es considerado el más favorable.

Los otros requisitos son el uso de solventes como el hexano y el etanol son necesarios para el proceso. Los métodos de extracción por

ultrasonido y por microondas pueden También puede ser beneficioso si otras fuentes no están disponibles. (Richmond, 2004)

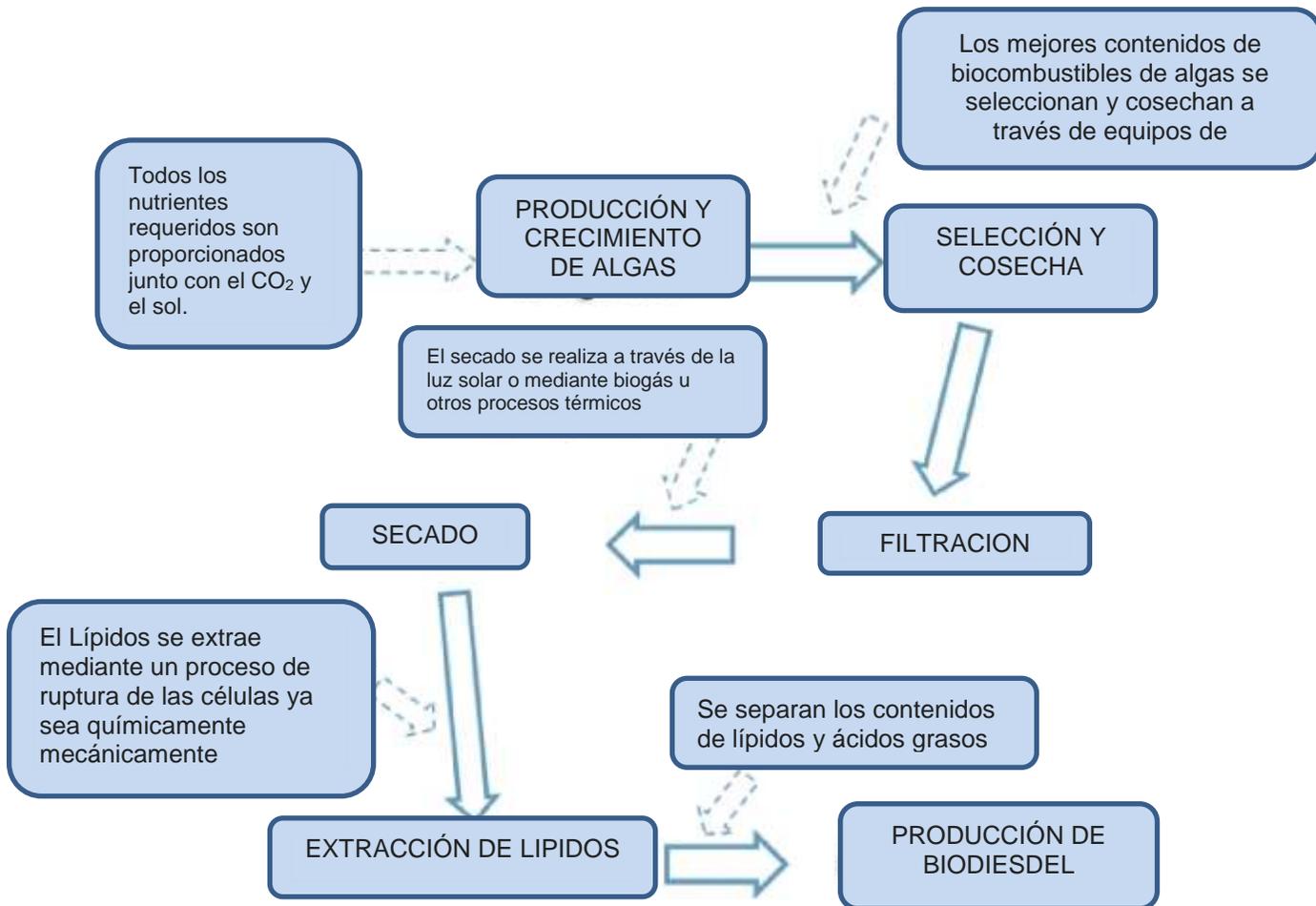


Figura 3: Proceso general de producción de biodiesel a partir de algas a pequeña escala

La flecha punteada indica la adición a pasos específicos que se han resaltado con letras en negrita y flechas con líneas completas

Fuente: Khan *et al.* (2017)

La transesterificación

Garibay-Hernández *et al.* (2009) Es la reacción química ocurrida entre los aceites (triacilglicéridos) y un alcohol (comúnmente metanol, etanol, propanol o butanol) para producir glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos, los cuales son conocidos como biodisel. Los principales

factores que influyen en el proceso son la relación molar alcohol:glúcidos, el tipo de catalizador (álcali, ácido, lipasas), la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima. En la actualidad, la mayoría del biodiesel es producido mediante transesterificación alcalina, a causa de su rapidez y condiciones moderadas que la caracterizan (Ma & Hanna, 1999; Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Vasudevan & Briggs, 2008).

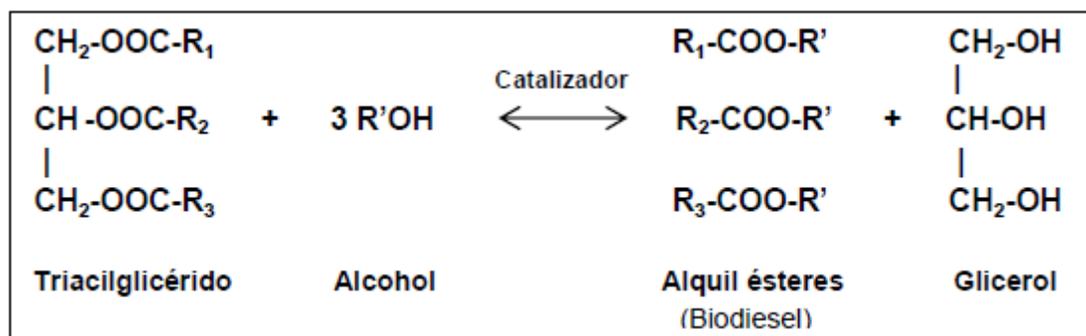


Figura 4. Reacción general de transesterificación. R1, R2, R3 y R' son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas)

Fuente: (Ma & Hanna, 1999; Fukuda *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2008).

2.2.2 Marco conceptual

Microalgas

Las microalgas tienen capacidad para sobrevivir en condiciones diversas y extremas, lo cual se refleja en la enorme diversidad y muchas veces a su inusual patrón de lípidos celulares (Sharma *et al.*, 2012). El mismo autor refiere que algunas microalgas pueden también modificar el metabolismo de los lípidos de manera eficiente en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. En condiciones óptimas de crecimiento, se producen grandes cantidades de biomasa microalgal, pero con contenidos lipídicos relativamente bajos, en condiciones ambientales desfavorables o estrés, muchas microalgas

alteran sus rutas biosintéticas de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos, lo que permite que las microalgas puedan soportar estas condiciones adversas. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo; los estímulos físicos son la temperatura y la intensidad luminosa (Rodolfi *et al.*, 2009; Sims y Christenson, 2011). La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos (Courchesne *et al.*, 2009).

Chorella sp

Sandoval (2013) El género *chlorella*, encierra un conjunto de algas verdes que poseen la capacidad de hacer fotosíntesis, producir azúcares a partir del CO₂ y luz solar fuentes de energía.

Este género está conformado por alrededor de 10 especies genéticamente clasificadas; son células de 2 a 12 µm esféricas o elipsoidales Figura 6 y se propagan por auto esporas. Se las encuentra habitualmente en el suelo y agua dulce pero algunos especies, generalmente las más pequeñas (1 a 2 µm) se las puede encontrar formando parte del fitoplacton, y como endosimbiontes en invertebrados, esponjas de agua dulce y algunos ciliados. genéticamente, parecen ser un género con mucha diversidad genética, estudios de hibridación de ADN indican que muchas especies no están estrechamente relacionados. Hoek et al (1994).

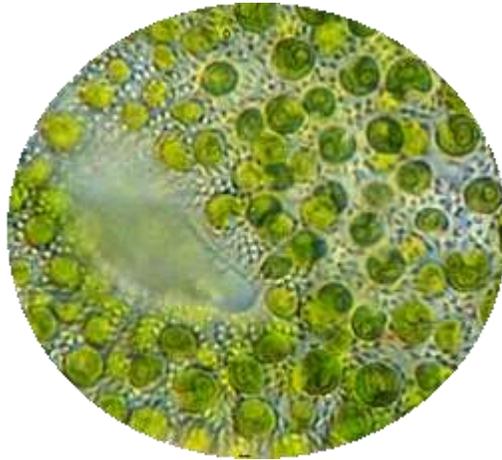


Figura 5. Morfología de la Chlorella sp

Fuente:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Chlorella.png>

Biorreactores

El crecimiento de microalgas se efectuó en biorreactores tanques agitados y sujetos a tres niveles de escalamiento.

En primer nivel se trabajó con el propósito de establecer la debida comprobación fenotípica del cultivo puro de *Scenedesmus spp*; para ello, las muestras fueron cultivadas en matraces de 1L de capacidad a temperatura ambiente (18-22°C), con un fotoperiodo día:noche de 12 horas de luminosidad (intensidad lumínica de 12 $\mu\text{mol/ms}$) y 12 horas de oscuridad, y en agitación constante a razón de 300 mL/min de aire es estéril. Gonzales J, Terán A (2013)



Figura 6. Biorreactor tanque agitado, bajo condiciones de laboratorio
Fuente: Gonzales J, Terán A (2013)

Biodiesel

El biodiesel se define como un metil éster obtenido a partir de aceites vegetales o grasas animales, de características similares al diesel, que se prestan a sustituirlo total o parcialmente como combustible de motores de combustión interna, puesto que su uso representa una excelente opción desde el punto de vista ecológico al reducir las emisiones de dióxido de carbono y la dependencia de fuentes de energía no renovables (Encinar *et al.*, 2011).

Generalmente las personas llaman “biodiesel” a cualquier combustible para motores diesel que sea originado de vegetales o animales, como el aceite usado para freír, sin cualquier tratamiento. Sin embargo, las definiciones de “biodiesel” que poseen mayor consistencia técnica son aquellas que caracterizan su composición química (mono-alquil ésteres de ácidos grasos), su origen (vegetal, animal), su empleo y sus características técnicas. Tejada *et al.* (2013)

La mayoría del biodiesel producido en el mundo es proveniente de aceites vegetales principalmente del aceite de colza en Europa y Canadá, y aceite de soya en Estados Unidos (Andersen & Weinbach,

2010). En Colombia, la principal materia prima para la producción de biodiesel es el aceite de palma, pues actualmente cuenta con más de 300.000 hectáreas sembradas en palma de aceite y cinco plantas productoras de biodiesel (Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia, 2012).

El biodiesel tiene en general un poder calórico inferior algo menor al diesel (7,795 kcal/l vs. 8,74 kcal/l). Su viscosidad cinemática en general está entre 1,9 y 6,0 cSt, aunque este parámetro no difiere sustancialmente del gasoil (1,3-4,1 cSt). Su densidad es de aproximadamente 0,878 kg/L a 15°C, y su flash point llega a sobrepasar los 130°C, a diferencia del gasoil, cuyo punto de inflamación es de apenas 60-80°C, lo que lo hace más seguro como combustible. Posee además un número cetano ligeramente mayor al del gasoil, y duplica el poder de lubricación del mismo. Tejada *et al.* (2013).



Figura 7: Proceso de producción de energía usando biomasa microalgar

Fuente: Adaptada de Wang *et al.*, (2008)

2.3 Definición de términos básicos

Biodiesel: es producido principalmente a partir del aceite de la semilla de canola (también conocida como colza) y el metanol, denominado comercialmente como RME (Metil Ester de canola), el cual es utilizado puro o mezclado con aceite diesel en las máquinas diesel, en proporciones que van desde un 5% hasta un 20% generalmente. En Alemania y Austria se usa puro para máximo beneficio ambiental (Clarimón *et al.*, 2005).

Biocombustible: están constituidos por alcoholes, éteres, ésteres y otros compuestos químicos provenientes de una fuente que no es de origen mineral o fósil, sino biológica, conocida como biomasa y son obtenidos por molturación de productos de origen agrícola y destilación de líquidos. Estos al combinarse con el oxígeno generan la combustión y liberan energía. González & Terán (2013)

Biomasa: La biomasa de las algas contiene tres componentes principales: las proteínas, cuyo porcentaje sobre el peso seco puede variar del 46-63%; los carbohidratos, con porcentajes generalmente entre el 10-17% (hasta 32% en *Dunaliella salina*); y los lípidos, con porcentajes que varían del 4-61%. En menor medida (<6%) se encuentran los ácidos nucleicos. De todas ellas, los lípidos son las biomoléculas de mayor interés en el proceso de obtención de biocombustibles. (Rodríguez, *et al* 2015)

Fotobiorreactor: es una unidad de cultivo, ya sea cerrado o con poca exposición a la atmósfera, que es considerado como un sistema desarrollado para la producción de microalgas, especialmente porque es posible controlar las variables físicas y químicas del cultivo. Contreras-Flores *et al.* (2003)

CAPITULO III

HIPOTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis General

Es posible obtener las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga *Chlorella sp* en Fotobiorreactor para la obtención del biodiesel

3.1.2 Hipótesis Específica

- Las características físico químicas determinaran la producción de biomasa
- Existe una relación entre la cantidad de lípido y la de biodiesel

3.2 Definición conceptual de variables

La producción de biomasa nos permitió obtener un % de lípidos para la producción del biodiesel

3.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	INDICE	METODO Y TECNICAS
V.INDEPENDIENTE % Lípido y de biodiesel	Parámetros de proceso de obtención de lípidos y de biodiesel	- Lípidos - Biodiesel	% %	- Extracción soxhlet - Transesterificación
V DEPENDIENTE Producción de biomasa	Parámetros Físico, químico para el control de la biomasa	- alga base seca - alga base húmeda.	Kg Kg	Método gravimétrico. AOAC

Fuente: Elaboración propia

CAPITULO IV

DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo y diseño de investigación

De acuerdo al propósito de la investigación, la naturaleza de los problemas y objetivos formulados en el presente trabajo reúne las características y condiciones suficientes para ser calificado como una investigación experimental, puesto que los conceptos teóricos acerca de la naturaleza del problema serán corroborados mediante la evaluación de los datos obtenidos.

4.2 Método de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó cumpliendo el método científico conformado por las siguientes etapas:

Cultivo de microalgas de la variedad *Chlorella sp* en fotobiorreactor, la obtención de la biomasa por centrifugación, extracción de los lípidos de las microalgas utilizando éter dietílico y por último la reacción de transesterificación para obtener el biodiesel.

La investigación desarrollada, es de tipo experimental con enfoque cuantitativo, debido a que se ha realizado las pruebas experimentales en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química

4.3 Población y muestra

La población estuvo conformado por la cantidad de biomasa obtenida de la microalga variedad *Chlorella sp* producida en los ensayos.

La muestra consta de una alícuota representativa de la biomasa producida.

4.4 Lugar de estudio y periodo de desarrollo

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de microbiología y laboratorio de investigación de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao.

4.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de la información

Las técnicas que utilizaron en el desarrollo de la investigación fueron:

4.5.1 Materia prima

Se adquirió 250 mL de microalgas de la variedad *chlorella sp* de la Universidad Agraria la Molina para luego ser cultivada en el laboratorio de microbiología.

4.5.2 Materiales, equipos y reactivos

Materiales de Laboratorio

- Vasos de 250 mL, 500 mL y 1 L
- Matraces de 500 mL
- Probetas de 100 mL
- Termómetro de escala de 0 -150 °C
- Pipetas 5mL y 10 mL
- Balones de fondo redondo de 250 y 500 mL
- Frascos de plástico de 25 y 50 mL
- Frascos de vidrio de 250 mL
- Placas Petri
- Mangueras de plásticos

Reactivos

- Fosfato monopotásico P.A - KH_2PO_4
- Cloruro de Calcio P.A CaCl_2
- Sulfato de Magnesio P.A- MgSO_4
- Nitrato de Sodio P.A – NaNO_3

- Fosfato ácido de potasio P.A K_2HPO_4
- Cloruro de sodio P.A – NaCl
- Ácido bórico P.A – H_3BO_3
- Agua destilada
- Solución de micro elementos
- Sulfato de Zinc P.A $ZnSO_4$
- Cloruro de Manganeso P.A – $MnCl_2$
- Trióxido de Molibdeno P.A – MoO_3
- Sulfato de Cobre P.A – $CuSO_4$
- Nitrato de Cobalto P.A- $Co(NO_3)_2$
- Sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético P.A Na_2EDTA
- Hidróxido de Potasio P.A – KOH
- Éter de petróleo
- Metanol

Equipos

- pH metro digital marca Hanna
- Microscopio
- Cámara de Neubauer
- Fotobiorreactores de Vidrio de 20 y 24 L
- Centrifuga refrigerada modelo BKC-TH16/18
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Espectrofotómetro de Infrarrojos modelo IFTIR-8400S
- Balanza analítica +/- 0,0001 g.
- Soxhlet

4.6 Análisis y procesamiento de datos

4.6.1 Método de análisis

- El crecimiento celular se determinó: diariamente mediante lectura en la cámara neubauer y la biomasa se determinó por método gravimétrico
- Las características físico químicas se midieron los siguientes parámetros:
 - o pH
 - o Temperatura
 - o Agitación de centrifugación
 - o Suministro de CO₂
 - o Adición de nutrientes
 - o Para mostrar los resultados de producción de biomasa y la tasa de crecimiento microalgal se usó Excel de Microsoft Office.
 - o Para la determinación del rendimiento de lípidos y biodiesel en %.
 - o Análisis por espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier

4.6.2 Método experimental

La metodología para obtención del biodiesel se realizó mediante pruebas experimentales como el cultivo de microalgas, obtención de la biomasa por centrifugación, la obtención de lípidos por método Soxhlet y biodiesel por método de transesterificación.

4.6.3 Diseño experimental

En la figura 8 se muestra la metodología experimental de la presente investigación.

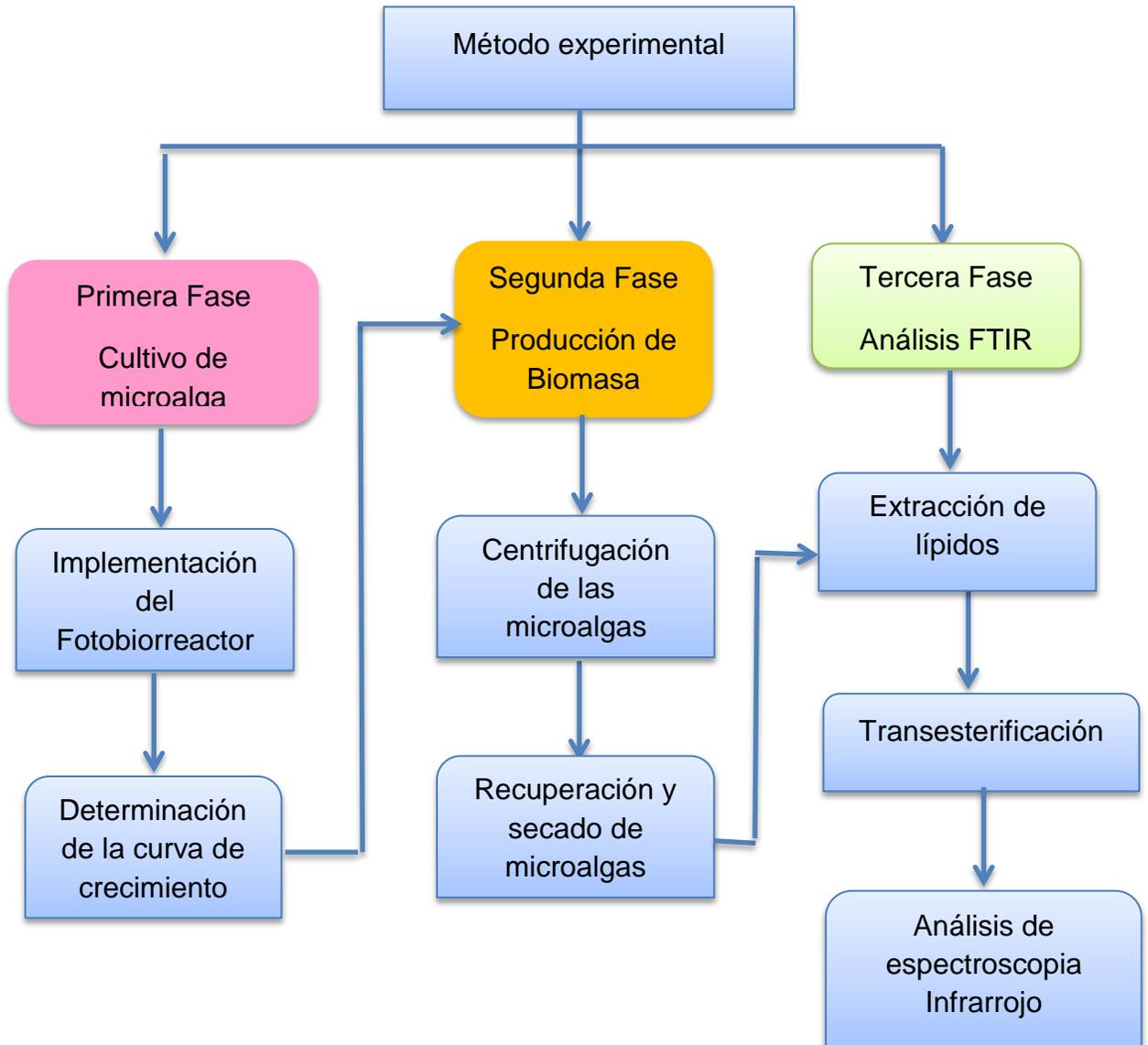


Figura 8: Procedimiento experimental realizada en tres etapas

Fuente: Elaboración propia

4.6.4 Formulación de los nutrientes para el cultivo de microalgas

Se prepararon las formulaciones que se indican en cada una de las tablas para asegurar el crecimiento de las microalgas. así mismo Vélez (2012) indica que la aclimatación de las microalgas a la restricción de nutrientes se caracteriza por la manifestación de respuestas específicas para el elemento limitado (inducción de sistemas de transporte de alta afinidad y de la síntesis de enzimas hidrolíticas para la liberación intra- o extracelular del nutriente), además de respuestas generales tales como cambios morfológicos, cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos.

Tabla 4
Medio Basal de Bold (BBM)

COMPONENTE	POR LITRO
KH_2PO_4	175 mg
CaCl_2	25 mg
MgSO_4	75 mg
NaNO_3	250 mg
K_2HPO_4	75 mg
NaCl	25 mg
H_3BO_3	11,42 mg
Solución de Micro elementó	1 mL
Solución 1	1 mL
Solución 2	1 mL

Fuente:<https://www.feriadelasciencias.unam.mx/antiores/feria17/21.pdf>

Tabla 5

Solución de Microelementos

COMPONENTE	g/Litro
ZnSO ₄	8,82
MnCl ₂	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄	1,57
Co(NO ₃) ₂	0,49

Fuente: <https://www.feriadelasciencias.unam.mx/antteriores/feria17/21.pdf>

Tabla 6

Solución 1

COMPONENTE	g/Litro
Na ₂ EDTA	50
KOH	3,1

Fuente: <https://www.feriadelasciencias.unam.mx/antteriores/feria17/21.pdf>

Tabla 7

Solución 2

COMPONENTE	Por Litro
FeSO ₄	4,98 g
H ₂ SO ₄ (Concentrado)	1 mL

Fuente: <https://www.feriadelasciencias.unam.mx/antteriores/feria17/21.pdf>

4.6.5 Implementación de los fotobiorreactores

El cultivo de microalgas de la variedad *chlorella sp* se realizó en fotobiorreactor de 20 y 24 L, para su alimentación se usó micronutrientes y macronutrientes como se indica en la tabla 4 a 7 se cultivó a luz natural, se controló las variables de pH, tiempo de crecimiento, temperatura, flujo de CO₂, se controló la biomasa seca y húmeda se colocó bombas de aire para evitar la sedimentación de las microalgas y permitir la homogenización de los nutrientes



Figura 9: Acondicionamiento de las microalgas en fotobiorreactores

Fuente: Elaboración propia

4.6.6 Curva de crecimiento

Cobos *et al.*, (2016) La densidad microalgal se determinara a la misma hora mediante recuento en cámara de Neubauer para contar algas pequeñas (de 2 a 30 μm y cultivos de densidades entre 5×10^4 y 5×10^7 cel/mL) (Richmond, 2004) bajo un microscopio óptico (40x) (Carl Zeiss-AxioLab.A1). Para cada réplica el conteo se realizó por duplicado. Para obtener el número de células/mL de acuerdo a (Shen *et al.*, 2010):

$$\text{N}^\circ \text{ cel/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células totales}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadros contados}} * 10,000$$

4.6.7 Tasa de crecimiento microalgar

La tasa de crecimiento microalgar se calculó diariamente mediante el microscopio, utilizando la siguiente fórmula (Rioboo *et al.*, 2003):

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln_2 (t - t_0)$$

Dónde: N_t = número de células o densidad óptima al tiempo final;

N_0 = número de células o densidad óptima al tiempo inicial;

t = tiempo final;

t_0 = tiempo inicial.



Figura 10: Cultivo de microalgas

Fuente: Elaboración propia



Figura 11. Observación microscopio células individuales

Fuente: Elaboración Propia

4.6.8 Producción de biomasa

La producción de la biomasa cultivadas de la *chlorella sp* se obtuvo por centrifugación a 4000 rpmx 60 minutos a 20°C en centrifuga Biobase, luego la biomasa se secó en estufa colocadas en placas Petri a 80 °C por 24 h. La biomasa se calculó teniendo en cuenta la diferencia de peso de biomasa seca contenida en la placa petri:

$$PB = Bf - Bi$$

Donde PB = Producción de biomasa; Bf = Peso de placa vacía; Bi = Peso de placa con biomasa seca.



Figura 12:Centrifuga refrigerada

Fuente: Elaboración propia



Figura 13 Frascos de capacidad de 25 y 50 mL de biomasa centrifugados

Fuente: Elaboración Propia



Figura 14 Biomasa concentrada

Fuente: Elaboración Propia

La biomasa cosechada se ha secado en estufa a 80°C de 48-72 horas (González y Terán, 2013)

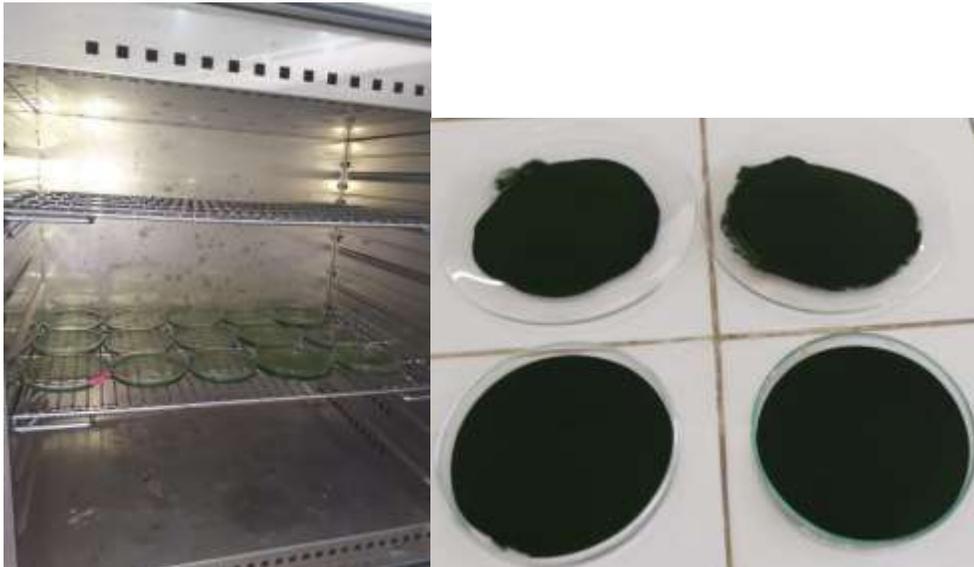


Figura 15. Secado de la biomasa

Fuente: Elaboración Propia

4.6.9 Extracción de lípidos

La biomasa seca se sometió a extracción con éter de petróleo por método Soxhlets para extraer los lípidos

1. Pesar 50 g (W) de muestra con aprox. 0,001 +/- 1 g dentro de un thimble.
2. Colocarlo dentro de un thimble y taparlo con algodón.
3. Pesar el balón (W_1) y luego agregar unos 300 mL de éter de petróleo
4. Luego colocarlo dentro del soxhlet y llevarlo a extracción por lo menos 20 ciclos de extracción con éter dietílico
5. Recuperar el solvente y colocarlo el balón dentro de la estufa de 105 °C x 2 horas hasta eliminar el olor del solvente.
6. Sacar de la estufa, enfriar en el desecador y pesar (W_2).

Cálculo y Expresión de los resultados

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100$$



Figura 16: Proceso de obtención del lípido mediante Soxhlet

Fuente: Elaboración propia

4.6.10 Reacción de transesterificación

Se preparó la mezcla del catalizador compuesto por hidróxido de potasio (KOH) al 85% y metanol al 95% se mezcló con el lípido de provenientes de las microalgas *chlorella sp* y se armó el equipo como se muestra en la figura 17 se inicia el proceso de transesterificación con agitación constante a 200 rpm y a temperatura de 60°C por un tiempo de 90 minutos.



Figura 17: Reacción de transesterificación para la obtención del biodiesel

Fuente: Elaboración propia

Trascurrido los tiempos de reacción, se llevaron los productos a un balón de fondo redondo y se armó el equipo como se muestra en la figura 18 para separar el biodiesel de la glicerina, metanol



Figura 18: Proceso de separación del biodiesel de los demás componentes
Fuente: Elaboración propia

Luego se coloca la muestra de biodiesel en una pera de separación y se lava con agua caliente a 60°C por tres veces para la separación y purificación formándose dos fases una capa superior conteniendo el biodiesel (metilesteres) y una inferior de glicerina. La capa superior debe ser retirada y llevada a un segundo embudo de decantación en donde se le adicionó agua para retirar residuos de metanol, catalizador y glicerina.



Figura 19: Proceso de separación del biodiesel de los demás componentes

Fuente: Elaboración propia

4.6.11 Determinación del rendimiento del Biodiesel (Rb)

Se realizó mediante la siguiente igualdad, donde los gramos de biodiesel puro son los gramos de biodiesel obtenidos al final del proceso (reacción, separación, lavado y secado) y los gramos de aceite de microalgas son los gramos de aceite adicionados al reactor al inicio de la reacción.

$$Rb = \frac{(g \text{ biodiesel puro})}{g \text{ aceite microalga}} \times 100\%$$

4.6.12 Análisis por espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier

Los fosfolípidos se analizaron por espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier – FTIR modelo modelo IFTIR-8400S. Las condiciones de trabajo fueron a longitud de onda de 400 a 1600 cm^{-1} , la radiación emitida por un diodo láser de luz infrarrojo IR. Se usó accesorio ATR con punta de diamante

el cual fue aplicado para colocar la muestra en el equipo. Se compararon los resultados con los espectros de compuestos orgánicos de la librería del equipo. Los espectros FTIR reportado se compararon con los grupos moleculares específicos.



Figura 20: Equipo FTIR modelo 8400S con PC incorporada

Fuente: Elaboración propia

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Resultados descriptivos

5.1.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado que dio mejor resultado fue el medio basal de Bold (BBM) Tabla 4, Soluciones de Microelementos Tabla 5, Solución 1 Tabla 6 y Solución 2 Tabla 7.

5.1.2 Crecimiento algar

Se cultivó las microalgas *Chlorella sp* durante 52 días a temperatura ambiente y pH entre 7-9 con suministro de CO₂ de flujo 2,5 L/min, con luz natural y su evaluación fue durante la fase exponencial hasta los (52 días).



Figura 21: Crecimiento de *Chlorella sp* en Fotobiorreactor acondicionados con inyección de CO₂

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8
Características físicas que se controlaron durante el crecimiento de las microalgas

Tiempo (días)	pH	T(°C)	Flujo CO ₂ L/min
0	8,2	18,0	0,25
7	8,2	19,5	0,25
14	8,3	19,0	0,25
21	8,5	18,5	0,25
28	8,4	19,0	0,25
31	8,0	19,5	0,25
38	8,2	20,0	0,25
45	8,1	21,0	0,25
52	8,4	20,5	0,25
Promedio	8,3	19,4	0,25

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9
Lectura del Crecimiento (celx10⁶ mL) Chlorella sp

Tiempo (días)	Cámara de Neubauer			Promedio (Población cel(mL))
	M1	M2	M3	
0	1	4	2	2,33
7	14	4	6	8,00
14	19	26	24	23,0
21	62	52	63	59,0
28	64	66	58	62,7
31	72	56	69	65,7
38	74	68	66	69,3
45	78	72	65	71,7
52	82	78	67	75,7

Fuente: Elaboración propia

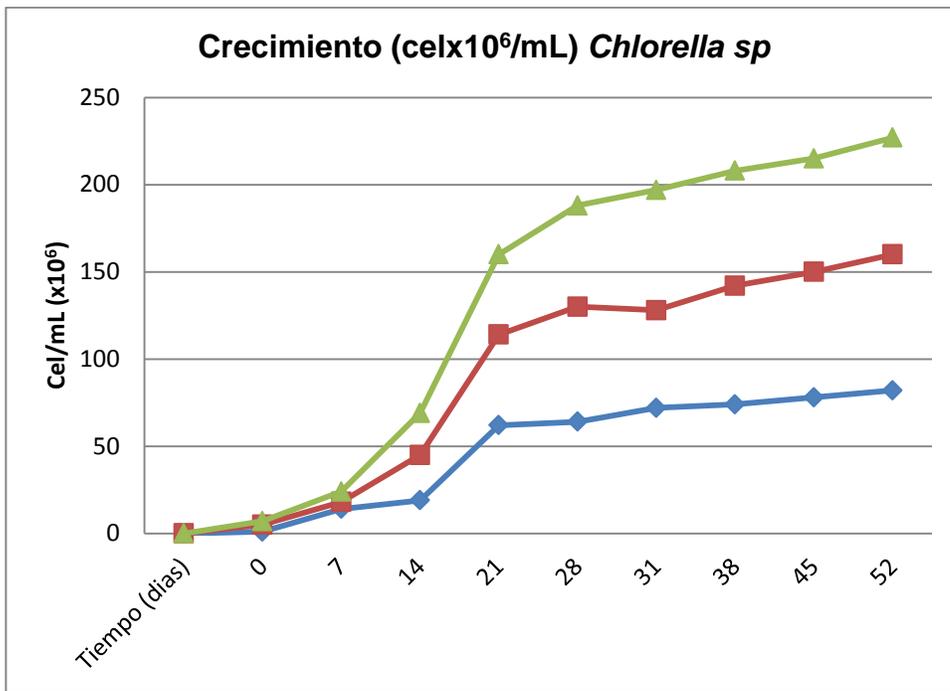


Figura 22: Crecimiento (celx10⁶ mL) *Chlorella sp* evaluada durante la fase exponencial (52 días)

Fuente: Elaboración propia

5.1.3 Producción de Biomasa

La biomasa se obtuvo por diferencia entre la biomasa húmeda menos biomasa seca después de haber realizado la centrifugación después de 52 días de cultivo. Se obtuvo un promedio de 0,77 g/L de las 4 muestras no se evidencio diferencia significativa (ANOVA, P<0,05) en la producción de biomasa en las cuatro muestras.

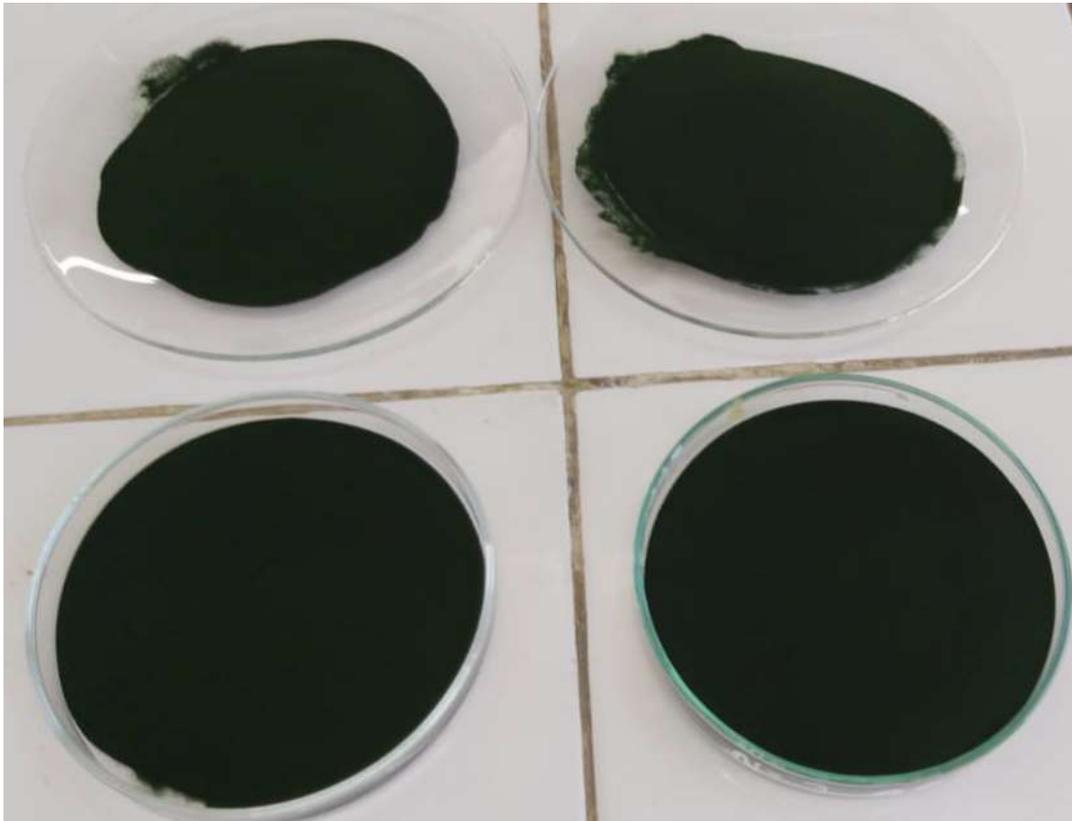


Figura 23: Muestra de Biomasa seca de microalgas *chlorella sp*

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10

Biomasa seca de microalga chlorella sp

Muestra	g/L
M1	0,92
M2	0,69
M3	0,73
M4	0,76
Promedio	0,77

Fuente: Elaboración propia

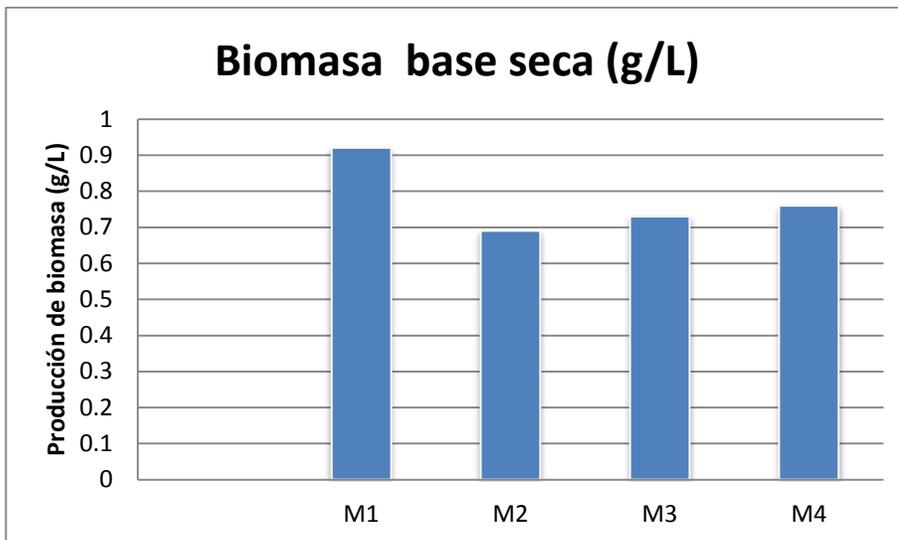


Figura 24: Biomasa en base seca de microalgas *chlorella sp*

Fuente: Elaboración propia

5.1.4 Extracción y análisis de lípidos

Con la biomasa seca se realizó la extracción de lípidos totales usando éter de petróleo como solvente el análisis se realizó en las cuatro muestras como se muestra en la figura 24, el promedio fue de 11,68 g/L de la biomasa total se obtuvo 46,7 g/L de lípidos totales

Tabla 11

Lípidos obtenidos de biomasa seca microalga chlorella sp

Muestra	g/L
M1	11.68
M2	12,22
M3	10,98
M4	11,82
Promedio	11,67

Fuente: Elaboración propia

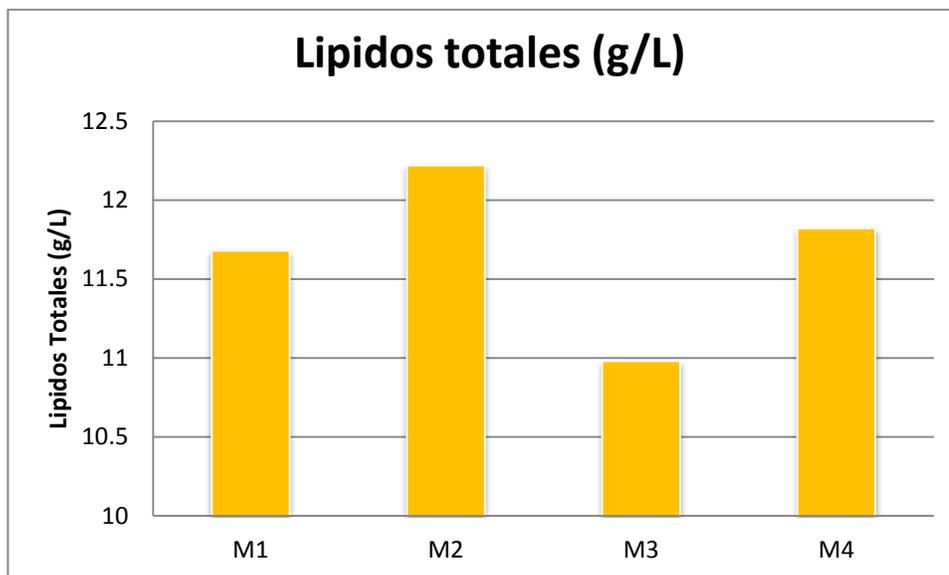


Figura 25: Lípidos totales obtenidos de biomasa seca

Fuente: Elaboración propia

5.1.5 Rendimiento del Biodiesel (Rb)

Mediante la ecuación se calculó de rendimiento de biodiesel se calculó como sigue.

$$Rb = \frac{26,76 \text{ g}}{46,7 \text{ g}} \times 100\% = 57,17\%$$

Por lo que se tuvo un 57,17% de rendimiento de biodiesel

5.1.6 Resultado de espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier

La muestra de biodiesel se analizó con el equipo FTIR comparado con un estándar y se encontró que el ácido oleico se encuentra en una longitud de onda de 723 cm^{-1} similar a la muestra de biodiesel

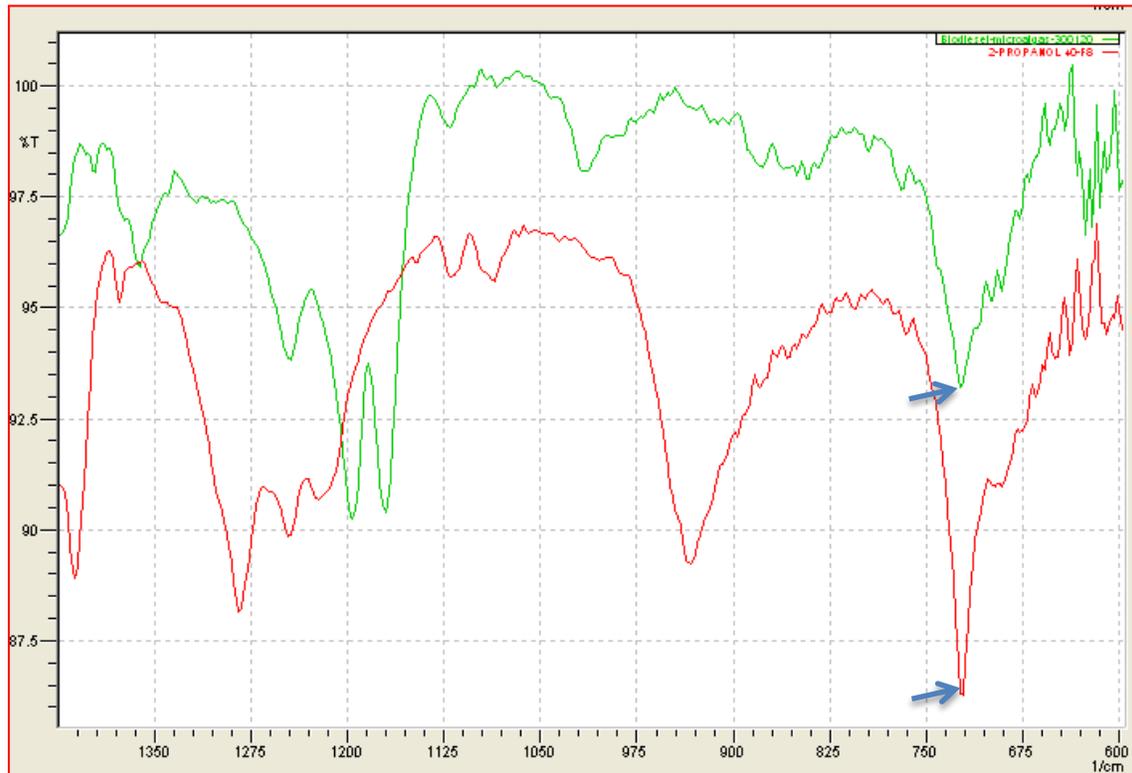


Figura 26: Espectro de transmisión FTIR (línea roja) muestra estándar y línea verde es la muestra biodiesel

Fuente: Elaboración propia

5.2 Resultados inferenciales

En la tabla 8 se encuentra los resultados de los análisis de pH, Temperatura, Flujo de CO₂ que se controlaron durante el periodo de ejecución de proyecto que son variables importantes a controlar para evitar que las microalgas *chlorella sp* se mueran

En la figura 22 de crecimiento permite proponer inferencia de probabilidad a mayor tiempo y mientras la disponibilidad de nutrientes no se agote se puede obtener mayor cantidad de biomasa pero a una tasa de producción muy reducida.

5.3 Otro tipo de resultados de acuerdo a la naturaleza del problema y la hipótesis

5.3.1 Características físico química que determinan la producción de biomasa

Las características físicas y químicas que se lograron para obtener la biomasa fue pH: 7-9; Temperatura. 19-26 °C, nivel de flujo de CO₂ fue de 0,25 L/min como se muestra en la tabla 8.

La utilización de fertilizantes agrícolas a muy bajas concentraciones también permite el crecimiento de microalgas y por eso de forma natural las microalgas *chorellas sp* se desarrollan en las acequias de drenaje o acequias colectoras de riego. Otro medio de crecimiento fue usando fertilizante agrícola de tipo 202020

5.3.2 Relación entre la cantidad de lípido y biodiesel

A mayor cantidad de lípidos g/L se obtiene mayor cantidad de biodiesel la relación es directamente proporcional.

$$biodiesel = \frac{26,76 \text{ g Biodiesel}}{46,7 \text{ g Lípido}} \times 100\% = 57,17\%$$

CAPITULO VI

DISCUSION DE RESULTADOS

6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados

Hipótesis general

De acuerdo a los resultados con los medios utilizados se ha observado que hay abundante producción de masa celular que nos ha permitido determinar un aceptable rendimiento tanto lípidos como en el biodiesel

Hipótesis específica

- De acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla 8 permitieron determinar las características físicas y químicas para la producción de biomasa para la cual se controló el pH en un promedio 8,3; Temperatura: 19,4 °C; Flujo de CO₂: 0,25 L/min. durante los 52 días de análisis.
- La relación que existe entre la cantidad del lípido y biodiesel es directamente proporcional a mayor cantidad de lípido mayor cantidad biodiesel.

6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios similares

Los tofobiorreactores usado para el crecimiento de las microalgas *Chlorella sp* fueron de 20-24 L con agitación constante de flujo de CO₂ y se tomó como referencia el tanque biorreactor agitado bajo condiciones de laboratorio de Gonzales J y Terán A (2013).

De acuerdo a los resultados del trabajo de investigación para obtener el biodiesel se trabajó en tres etapas.1) el cultivo de *microalgas sp* para la

obtención de la biomasa 2) cosecha de la biomasa y disrupción celular y 3) reacción de transesterificación para la conversión del biodiesel siguiendo la metodología de (Koller *et al*, 2012).

El crecimiento algal se realizó mediante cámara de Neubauer hasta un tiempo de 52 días dando como resultado $75,7 \times 10^6$ cel/mL similares resultados obtuvo Cobos *et al.*, (2016) La densidad microalgal se determinara a la misma hora mediante recuento en cámara de Neubauer para contar algas pequeñas (de 2 a 30 μ m y cultivos de densidades entre 5×10^4 y 5×10^7 cel/mL) (Richmond, 2004) bajo un microscopio óptico (40x) (Carl Zeiss-AxioLab.A1). Para cada réplica el conteo se realizó por duplicado. Para obtener el número de células/mL de acuerdo a (Shen *et al.*, 2010).

Tejeda-Benítez *et al.*, (2015) investigaron el cultivo de las microalgas *Chlorella sp* y *Dunaliella Salina* bajo diferentes condiciones de pH y concentración de nitrógeno mg/L y la caracterización de los aceites obtenidos, con el fin de evaluar su potencial uso como materia prima en la producción de Biodiesel. Las condiciones de pH 8.5. En comparación con el presente trabajo de investigación también de controló pH entre 7-9 siendo el promedio de 8.3. Vélez (2012) también determinó el pH en un rango de 7-9 el cultivo de microalgas.

Rouyu X y Yongli M (2011) han mostrado su preocupación internacional durante los últimos años, porque las microalgas han sido fuertemente recomendadas como sustituto más prometedor para los cultivos oleaginosos. Sin embargo la comercialización de biodiesel de microalgas se ve obstaculizado por los altos costos de la materia prima y los procesos de producción convencional.

Similares condiciones se encontró en el presente trabajo se tuvo que realizar diferentes pruebas experimentales para determinar el medio adecuado para el crecimiento de las microalgas, el control de pH, T°C, Flujo de CO₂, y obtener la biomasa por otro lado no se contaba con equipos adecuada para la centrifugación siendo difícil obtener la biomasa porque se requiere controlar las rpm en este caso fue 4 000 rpm en 60 minutos y a 20°C.

La biomasa cosechada se ha secado en la estufa a 80° por 48-72 horas de la misma manera que fue determinado por (González y Terán, 2013).

Avila F, (2015), Determino que la transesterificación de ácidos grasos ha sido el método comúnmente empleado en la modificación de aceites vegetales para su implementación como biodiesel en motores de combustión interna. Las variables que intervienen en la reacción de transesterificación para la obtención del biodiesel son: tipo de materia prima, alcohol, catalizador y concentración del mismo, entre otras. De la misma forma en la presente investigación para la obtención del biodiesel se realizó por transesterificación controlando la variable de temperatura a 60°C, tiempo 90 minutos, agitación 200 rpm, solvente metanol al 95% y catalizador KOH al 85%. Garibay-Hernández *et al.*, (2009) concluyen que en la actualidad, la mayoría del biodiesel es producido mediante transesterificación alcalina, a causa de su rapidez y condiciones moderadas que la caracterizan.

6.3 Responsabilidad ética

El trabajo realizado cumple con lo estipulado en el código de ética de investigación de la universidad nacional del Callao, resolución N° 210-2017-CU.

CONCLUSIONES

El estudio realizado se concluye lo siguiente:

- Al aplicar condiciones apropiadas en el cultivo de las microalgas *chorella sp* se obtiene biodiesel.
- Las características físico químicas del medio de crecimiento de la microalga *Chlorella sp* fueron: pH 8,3; Temperatura: 19,4 °C; Flujo de CO₂: 0,25 L/min, crecimiento algal 75,7 x10⁶ cel/mL y el medio basal de Bold (BBM) es el más adecuado para el desarrollo y producción de biomasa de mciroalgas *chlorella sp* representado en peso promedio de 0,77 g/L de biomasa.
- Se determinó la cantidad de lípidos con un promedio de 11,67 g/L con un rendimiento de 57,17% de biodiesel.

RECOMENDACIONES

- Continuar investigando sobre el cultivo de microalgas *chlorella sp* para el tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas, ya que actualmente se tiene problemas de contaminación ambiental y no cumplen con los Valores máximos admisibles.
- Preparar proyectos productivos de microalgas *chlorella sp* para utilizar los recursos acuáticos tanto los del río Rima como el río Chillón con el fin de reducir la contaminación ambiental.
- Fomentar el cultivo de microalgas *chlorellas sp* ya que se tiene alto contenido lípidos y se pueden utilizar en la industria farmacéutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, O. y Weinbach, J.E. (2010). Residual animal fat and fish for biodiesel production. Potentials in Norway. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1183-1188.
- Arredondo & Vázquez-Duhalt R (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.
- Avila F (2015) Biodiesel: Estudios Analíticos y Desarrollo de Métodos de Análisis para el Control de Calidad. Tesis para optar el grado en química. Universidad Nacional del Sur Bahía Blanca, Buenos Aires Argentina
- Al-Zuhair S (2007) Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1: 57-66
- Beer LL, Boyd ES, Peters JW & Posewitz MC (2009) Engineering microalgae for biohydrogen and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 264-271
- Ben-Amotz A, Tornabene TG & Thomas WH (1985) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
- Clarimón, L., C. Fernández y B. Sánchez (2005). Informe sobre el empleo de combustibles renovables. Biodiesel. Aragón, España. Departamento del Medio Ambiente CC.OO. Disponible en Web: http://www.aragon.ccoo.es/doc/informe_biodiesel.pdf
- Cobos Ruiz M, Paredes Rodríguez JD, Castro Gómez JC. Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta biol. Colomb.* 2016;21(1):17-26. recuperado: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
- Contreras-Flores, Julián Mario Peña-Castro, Luis Bernardo Flores-Cotera y Rosa Olivia Cañizares-Villanueva (2003) “*Avances en el diseño*

- conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas*". INCI v.28 n.8 Caracas.
- Courchesne M, Parisien A, Wang B, Lan Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol.* 2009;141(1-2):31-41.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306
- Chisti Y (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
- Cohen Z (1986) Products from microalgae. In: *Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A (ed.) CRC Press pp. 421-454
- Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM & Posewitz MC (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235- 240.
- Encinar, J. M.; Sánchez, N.; Martínez, G. y García, L. (2011). Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. *Bioresource Technology*, 102, 10907-10914.
- Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (2012). *Cifras Informativas del Sector Biocombustibles biodiesel de palma de aceite.* Recuperado el 12 de septiembre de 2012 de: <http://www.fedebiocombustibles.com>.
- Fischer CR, Klein-Marcuschamer D & Stephanopoulos G (2008) Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* 10: 295-304.
- Fukuda H, Kondo A & Noda H (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416.
- Garibay-Hernández, Adriana & Vazquez-Duhalt, Rafael & Sánchez-Saavedra, M. del Pilar & Serrano Carreón, Leobardo & Martínez, Alfredo. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.* 13. 38-61.

- Gatenby CM, Orcutt DM, Kreeger DA, Parker BC, Jones VA & Neves RJ (2003) Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J. Appl. Phycol.* 15: 1-11.
- Gonzales J, Terán A (2013) producción de biodiesel a partir de microalgas *Scenedesmus* spp. En fotobiorreactor tanque agitado. *Pueblo cont.* vol.24 [2] 370-391
- Gouveia L & Oliveira AC (2009) Microalgae as raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 269- 274.
- Griffiths MJ & Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.
- Grossman A & Takahashi H (2001) Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 163-210
- Guschina IA & Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45: 160-186
- Hoek, V.C (1994). *Algae: An introduction to Phycology*. USA Cambridge universitypress. (pp. 365). web. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB47S02.htm>
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M & Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.
- Huntley ME & Redalje DG (2007) CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.* 12: 573-608.
- Khan S, Siddique R, Sajjad W, Nabi G, Hayat K, Duan P, Yao L (2017) Biodiesel Production From Algae to Overcome the Energy Crisis. *HAYATI Journal of Biosciences* 24:163-167.
- Koller, M., A. Salerno, P. Tuffner, M. Koinigg, H. Böchzelt, S. Schober, S. Pieber, H. Schnitzer, M. Mittelbach & G. Braunegg. 2012.

- Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of Cleaner Production* 37: 377-388.
- Li Q, Du W & Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 749-756.
- Li X, Xu H & Wu Q (2007) Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 764-771.
- Liu B & Zhao Z (2007) Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 775-780.
- Ma F & Hanna MA (1999) Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol.* 70: 1-15.
- Meng X, Yang X, Xu X, Zhang L, Nie Q & Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 34: 1-5.
- Metzger P & Largeau C (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 486-496.
- Núñez E, Angulo G, Cadena L (2017) producción de biodiesel: oportunidades para la innovación en el sector energético. Universidad Del Magdalena, Santa Marta – Magdalena, Colombia.
- Rioboo C, Herrera C, Gonzales A. Análisis del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cultivos expuestos al herbicida isoproturon [Internet]. La Coruña: IX Conferencia Española de Biometría; 2003. p. 1-4. recuperado:<http://www.udc.gal/dep/mate/biometria2003/Archivos/ma47.pdf>
- Richmond A. 2004. *Handbook of Micro Algal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd.
- Rittmann BE (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 203-212.

- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G & Tredici MR (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L & Betenbaugh MJ (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:430-436.
- Rodríguez. P; Sánchez. Y; Zumalacárregui de Cárdenas. L; Pérez. O; Hernández. A; Echeveste de Miguel. P; Lombardi. A (2015) Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. Grupo Combustibles Alternativos, Facultad de Ingeniería Mecánica.
- Ruoyu, X ; Yongli, M (2011) Simplifying the Process of Microalgal Biodiesel Production Through In Situ Transesterification Technology. *J Am Oil Chem Soc.* 88:91-99
- Sandoval M (2013) Diseño, construcción y puesta en marcha de un fotobiorreactor piloto para el crecimiento de la microalga *Chlorella sp* en el laboratorio de biotecnología y energía renovables de la empresa eléctrica Quito. Proyecto de grado Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército-Quito.
- Sharma YC, Singh B & Upadhyay SN (2008) Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel.* 87: 2355-2373.
- Sharma K, Schuhmann H, Schenk P. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies.* 2012;5(5):1532-1553.
- Sims R, Christenson L. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and subproducts. *Biotechnol Adv.* 2011;29(6):686-702.
- Shen Y, Yuan W, Pei Z, Mao E. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;160(6):1674- 1684.

- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussnug JH, Posten C, Kruse O & Hankamer B (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, & Roessler P (1998) A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p. Recuperado: www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf
- Tejeda-Benitez L Henao D, Alvear-Alayón M, Castillo-Saldarroaga C (2015) caracterización y perfil lipidico de aceite de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.)*, Mayo-Agosto 2015, Vol. 24. No. 39. pp. 43-54
- Tejada C, Tejeda L, Villaboba A, Monroy L (2013) Obtención de biodiesel a partir de diferentes tipos de grasa residual de origen animal. *Universidad de Caldas revista.luna.azúl.*; 36: 10-25.
- Thompson Jr GA (1996) Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta.* 1302: 17-45. Waltz E (2009) Biotech's new gold? *Nat. Biotechnol.* 27: 15-18.
- Vasudevan PT & Briggs M (2008) Biodiesel production – current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 421-430.
- Vázquez-Duhalt R & Greppin H (1987) Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochem.* 26:885-889.
- Vélez, T (2012) Estudio sobre el modelado y control de las condiciones óptimas de cultivo de microalgas en fotobiorreactores para producción de biodiesel. Trabajo de fin de Máster en Informática Industrial.
- Wang, B., Y. Li, N. Wu, C. Q. Lan (2008). "CO₂ bio-mitigation using microalgae." *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(5): 707-718.

Williams PJ (2007) Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature*, 450: 478.

Wijffels RH (2008) Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol.* 26: 26-31.

Ynga G (2013) Cultivo masivo de microalgas en biorreactores verticales. Universidad Nacional San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. E.P.A. Biología.

Páginas Web:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Chlorella.pn>

ANEXOS
MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA A UTILIZAR
¿Cuáles son las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga <i>Chlorella sp</i> en Fotobiorreactor para la obtención del biodiesel?	Determinar las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga <i>Chlorella sp</i> en Fotobiorreactor para la obtención del biodiesel	Es posible obtener las condiciones apropiadas para el cultivo de la microalga <i>Chlorella sp</i> en Fotobiorreactor para la obtención del biodiesel	V. INDEPENDIENTE % de Lípidos % Biodiesel	Porcentaje de lípidos y biodiesel	- Lípidos - Biodiesel	- Extracción soxhlet - Transesterificación
			V DEPENDIENTE Producción de biomasa	Kilogramos de alga base seca y base húmeda.	- Alga base seca - Alga base húmeda.	- Método gravimétrico. AOAC
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA A UTILIZAR
¿Qué características físico químicas tiene el medio de crecimiento de la microalga <i>Chlorella sp</i> ?	Analizar las características físico químicas del medio de crecimiento de la microalga <i>Chlorella sp</i>	Las características físico químicas determinaran la producción de microalga <i>Chlorella sp</i>	Las características físico químicas del medio de crecimiento de las microalga <i>Chlorella sp</i>	características físico químicas del medio de crecimiento de las microalga <i>Chlorella sp</i>	- pH - Temperatura - Agitación - Suministro de CO ₂ - Adición de nutrientes	- pH metro - Termómetro - Rpm - mg/L - Micro y macronutrientes
¿Cuál será el rendimiento de en la producción de lípido y la producción de biodiesel?	Determinar el rendimiento de lípido y la producción de biodiesel	Existe una relación entre la cantidad de lípido y la de biodiesel	Rendimiento de lípido y de biodiesel	Porcentaje de lípidos y biodiesel	- Lípidos - Biodiesel	- Extracción soxhlet - Transesterificación