



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Ingeniería Bioquímica

**Producción *in situ* de biodiésel a partir de
Chlorella vulgaris, *Neochloris oleoabundans* y
Nostoc muscorum cultivadas en condiciones
mixotróficas**

Tesis que presenta:

María Guadalupe Mata Pérez

Para optar por el grado de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
EN EL ÁREA DE BIOPROCESOS**

Tutores:

**Dr. Juan Jáuregui Rincón †
Dr. Roberto Rico Martínez
Dra. Diana Linda Cárdenas Chávez**

Asesora:

Dra. Norma Angélica Chávez Vela

Aguascalientes, Ags. a 04 de noviembre de 2024.

M. en C. Jorge Martín Alferez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

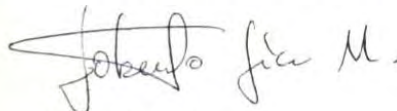
Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ con ID 19228 quien realizó LA TESIS titulada: PRODUCCIÓN IN SITU DE BIODIESEL A PARTIR DE *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* Y *Nostoc muscorum* CULTIVADAS EN CONDICIONES MIXOTRÓFICAS, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 5 de noviembre de 2024.



Roberto Rico Martínez
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES
(UNIAUTAG)

M. en C. Jorge Martín Alferez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante **MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ** con ID 19228 quien realizó LA TESIS titulado: **PRODUCCIÓN IN SITU DE BIODIESEL A PARTIR DE *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* Y *Nostoc muscorum* CULTIVADAS EN CONDICIONES MIXOTRÓFICAS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 11 de noviembre de 2024.

Diana Linda Cárdenas Chávez
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



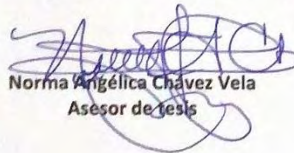
M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ** con ID 19228 quien realizó LA TESIS titulada: **PRODUCCIÓN IN SITU DE BIODIESEL A PARTIR DE *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleabundans* y *Nostoc muscorum* CULTIVADAS EN CONDICIONES MIXOTRÓFICAS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"


Aguascalientes, Ags., a 6 de noviembre de 2024.



Norma Angélica Chávez Vela
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 11/06/19
uaa.mx / 



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 13/11/2024

NOMBRE: MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ **ID** 19228

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** Química y Biorremediación

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico
TÍTULO: Producción in situ de biodiésel a partir de *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleabundans* y *Nostoc muscorum* cultivadas en condiciones mixotróficas

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Hoy en día necesidad de producir combustibles orgánicos como el biodiésel para sustituir a los combustibles derivados del petróleo es una necesidad urgente para combatir la contaminación ambiental ligada al cambio climático. Este trabajo contribuye a esta temática en donde se espera una producción eficiente de biocombustibles empleando microalgas cuya producción contamina menos, no roba espacio a la agricultura y en un futuro no muy lejano puede generar puestos de trabajo.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
SÍ				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SÍ				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SÍ				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SÍ				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SÍ				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SÍ				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SÍ				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SÍ				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SÍ				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
SÍ				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SÍ				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SÍ				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SÍ				Coincide con el título y objetivo registrado
SÍ				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SÍ				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SÍ				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí No

Elaboró: ROBERTO RICO MARTÍNEZ

FIRMAS

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dr. Gilberto Alejandro Ocaño Acosta (P.A.)

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocaño Acosta

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del IAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, designado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: "... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
 Actualización: 01
 Emisión: 28/04/20

[NS] Editor Decision

2024-08-07 12:59 PM

Roberto Rico Martínez, María Guadalupe Mata-Pérez, Diana Linda Cárdenas-Chávez , Juan Jáuregui-Rincón :

We have reached a decision regarding your submission to Nova Scientia, "Essential fatty acids as major lipid fraction in *Nostoc muscorum* by optimization of mixotrophic culture".

Our decision is to: Accept Submission

Reviewer B:

Recommendation: Accept Submission

II. Comments that supports your opinión:

*It is strongly recommended to focus on the objective and **critical evaluation of the content** of the papers. If there is a significant amount of aspects so it is suggested to send an attachment with the same*

The introduction must include information from references no older than 5 years, at least 60% must contain citations from 2017 onwards. It is convenient to include more current references in the results and discussion section.

In methodology, lipid analyses by spectrophotometry do not mention which substance was used for the calibration curve.

They should mention the brand of equipment used, such as stove and scale, etc.

In the references section, some of the manuscript's references are not cited.

The manuscript shows novel information. Its experimental design is well planned and executed, and it can be accepted after minor changes according to the suggestions made.

Reviewer D:

Recommendation: Accept Submission

Nova Scientia

Equipo Editorial

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por darme la oportunidad de seguir mi formación académica y carrera profesional, y al CONACyT por la beca 267054 otorgada para poder realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Juan Jáuregui Rincón † por aceptarme como su estudiante y brindarme todo el apoyo necesario, dándome las lecciones y herramientas no sólo en la parte académica, sino que con su ejemplo de vida trascendieron y me permitieron lograr proyectos que antes de conocerlo, me parecían imposibles de alcanzar.

Al Dr. Roberto Rico Martínez por su genuino interés en que continuara y concluyera mis estudios de doctorado, por su apoyo y contribución en mi formación académica.

A la Dra. Diana L. Cárdenas por sus observaciones y comentarios que han contribuido en mi formación académica, así como por todos los recursos que puso a disposición para que este proyecto estuviera lo más completo posible.

A la Dra. Norma Chávez por estar desde el inicio hasta el final e impulsarme a seguir adelante. También agradezco sus observaciones y mejoras en el escrito de tesis.

Al Dr. Antonio Lozano por todas sus sugerencias e instrucción en el funcionamiento de equipo de laboratorio que utilicé, y por su disposición a ayudarme cada vez que tenía dudas.

A la I.Q.I. Martha Evelia Pérez y L.A.Q.B. Verónica Velasco por todo su apoyo y amistad sincera.

A mi esposo, Alfonso Cervantes, y a mi hija, Andrea, que estuvieron en este proceso, acompañándome y brindándome su apoyo, comprensión y amor, sin los que no hubiera sido posible acabar mis estudios.

DEDICATORIA

A mi mamá, Ma. Teresa Guadalupe †. Empezó conmigo este proceso y aunque el día de hoy no esté físicamente conmigo, su legado sigue vivo en mi corazón.

A mi hija, Andrea, con amor, porque me motiva a ser ejemplo y seguir creciendo en todas las áreas de mi vida.

A mi esposo, compañero de vida y coach personal, Alfonso, por sostenerme con amor e impulsarme con firmeza a seguir adelante cada vez que quise renunciar.

A mi tutor, Dr. Juan Jáuregui Rincón †, quien tampoco se encuentra físicamente. Con infinito agradecimiento y honrando su memoria.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Biocombustibles	19
1.2. Biodiésel	20
1.3. ¿Por qué utilizar algas para producir biodiésel?	25
1.4. ¿Cómo se produce el biodiésel a partir de biomasa algal?	27
1.5. Transesterificación in situ	36
1.6. Metodología de superficie de respuesta (MSR)	38
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo general	41
4.2. Objetivos particulares	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1. Microorganismos de estudio	42
5.1.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	42
5.1.2. <i>Neochloris oleoabundans</i>	42
5.1.3. <i>Nostoc muscorum</i>	42
5.2. Sistemas de cultivo	42
5.2.1. Cultivos de mantenimiento y desarrollo del inóculo	42
5.2.2. Cultivos experimentales	43
5.3. Procedimiento analítico	44

5.3.1.	Toma de muestras y preparación de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oleoabundans</i>	44
5.3.2.	Toma de muestras y preparación de <i>N. muscorum</i>	44
5.3.3.	Evaluación del crecimiento celular	44
5.3.4.	Evaluación del contenido de lípidos	45
5.3.5.	Evaluación del consumo de sustratos	46
5.4.	Perfiles de crecimiento, producción de lípidos y consumo de nutrientes	48
5.5.	Diseño experimental del cultivo mixotrófico	48
5.5.1.	Cultivo mixotrófico de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oleoabundans</i>	49
5.5.2.	Cultivo mixotrófico de <i>N. muscorum</i>	50
5.6.	Verificación de las condiciones de optimización del cultivo mixotrófico	50
5.7.	Efecto de condiciones de estrés en los cultivos optimizados en la producción de lípidos y composición del biodiésel	51
5.8.	Análisis de la composición de ácidos grasos del biodiésel	52
5.9.	Estimación de las propiedades combustibles del biodiésel	53
5.9.1.	Índice de cetano	54
5.9.2.	Índice de saponificación	54
5.9.3.	Índice de yodo	54
5.9.4.	Grado de insaturación	55
5.9.5.	Estabilidad oxidativa	55
5.9.6.	Viscosidad cinemática	56
5.9.7.	Densidad	57
5.9.8.	Poder calorífico superior	57
5.9.9.	Punto de niebla	58
5.9.10.	Punto de obstrucción de filtros en frío	58
5.9.11.	Punto de fluidez	59
5.9.12.	Punto de inflamabilidad	59

6. RESULTADOS	60
6.1. Selección de las especies de estudio	60
6.2. Cultivos axénicos de las especies de estudio	61
6.3. Desarrollo del sistema de cultivo	63
6.4. Perfiles iniciales de crecimiento, consumo de nutrientes y porcentaje de lípidos	66
6.5. Efecto del cultivo mixotrófico sobre la biomasa y los lípidos de <i>C. vulgaris</i>	70
6.5.1. Análisis de la regresión de superficie de respuesta para <i>C. vulgaris</i>	71
6.5.2. Análisis de las superficies de respuesta para <i>C. vulgaris</i>	74
6.5.3. Desarrollo de las condiciones óptimas del cultivo mixotrófico para <i>C. vulgaris</i>	78
6.6. Efecto del cultivo mixotrófico sobre la biomasa y los lípidos de <i>N. oleoabundans</i>	79
6.6.1. Análisis de la regresión de superficie de respuesta para <i>N. oleoabundans</i>	80
6.6.2. Análisis de las superficies de respuesta para <i>N. oleoabundans</i>	83
6.6.3. Desarrollo de las condiciones óptimas del cultivo mixotrófico para <i>N. oleoabundans</i>	87
6.7. Efecto del cultivo mixotrófico sobre la biomasa y los lípidos de <i>N. muscorum</i>	88
6.7.1. Análisis de la regresión de superficie de respuesta para <i>N. muscorum</i>	89
6.7.2. Análisis de las superficies de respuesta para <i>N. muscorum</i>	94
6.7.3. Desarrollo de las condiciones óptimas del cultivo mixotrófico para <i>N. muscorum</i>	97

6.8. Obtención y análisis de la composición de biodiésel a través de transesterificación in situ	98
6.9. Producción de lípidos inducida por condiciones de estrés en los cultivos optimizados	103
6.10. Efecto de las condiciones de estrés en la composición de los ácidos grasos	106
6.11. Estimación de las propiedades del biodiésel	118
7 DISCUSIÓN	130
8 CONCLUSIONES	136
9 REFERENCIAS	137



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de biocombustibles: fuente de materia prima, proceso y productos obtenidos (Tomado de Dutta et al., 2014).	20
Cuadro 2. Especificaciones de las propiedades del biodiésel y del diesel de petróleo (Modificado de Joshi <i>et al.</i> , 2017).	21
Cuadro 3. Comparación de las eficiencias de producción de biodiésel a partir de aceites vegetales y algales (Lackner, 2017).	26
Cuadro 4. Consideraciones y requerimientos para el cultivo algal en diferentes modos (Bassi et al., 2014).	31
Cuadro 5. Niveles de los factores utilizados en el diseño central compuesto para <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oleoabundans</i> .	49
Cuadro 6. Niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken para <i>N. muscorum</i> .	50
Cuadro 7. Tratamientos para la inducción de la producción de lípidos por condiciones de estrés	52
Cuadro 8. Matriz del diseño central compuesto de la MSR con las respuestas observadas en el cultivo mixotrófico de <i>C. vulgaris</i> .	70
Cuadro 9. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta para <i>C. vulgaris</i> .	71
Cuadro 10. Validación del modelo de MSR de <i>C.vulgaris</i> .	78
Cuadro 11. Matriz del diseño central compuesto de la MSR con las respuestas observadas en el cultivo mixotrófico de <i>N. oleoabundans</i> .	79
Cuadro 12. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta para <i>N. oleoabundans</i> .	80

Cuadro 13. Validación del modelo de MSR de <i>N. oleoabundans</i> .	87
Cuadro 14. Matriz del diseño Box-Behnken de la MSR con las respuestas observadas en el cultivo mixotrófico de <i>N. muscorum</i> .	88
Cuadro 15. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta para <i>N. muscorum</i> .	89
Cuadro 16. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta con los modelos reducidos, para <i>N. muscorum</i> .	91
Cuadro 17. Validación del modelo de MSR de <i>N. muscorum</i> .	97
Cuadro 18. Componentes en el estándar para la identificación y cuantificación de FAMEs.	98
Cuadro 19. Identificación y cuantificación de FAMEs obtenidos por transesterificación <i>in situ</i> .	100
Cuadro 20. ANOVA del porcentaje de lípidos de <i>C. vulgaris</i> , <i>N. oleoabundans</i> y <i>N. muscorum</i> cultivadas en sus medios optimizados y sometidas a condiciones de estrés.	104
Cuadro 21. Identificación y cuantificación de FAMEs de <i>C. vulgaris</i> bajo condiciones de estrés.	107
Cuadro 22. Identificación y cuantificación de FAMEs de <i>N.oleoabundans</i> bajo condiciones de estrés.	111
Cuadro 23. Identificación y cuantificación de FAMEs de <i>N. muscorum</i> bajo condiciones de estrés.	115
Cuadro 24. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación <i>in situ</i> a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la microalga <i>C. vulgaris</i> .	118

Cuadro 25. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación <i>ex situ</i> a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la microalga <i>C. vulgaris</i> .	120
Cuadro 26. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación <i>in situ</i> a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la microalga <i>N. oleoabundans</i> .	122
Cuadro 27. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación <i>ex situ</i> a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la microalga <i>N. oleoabundans</i> .	124
Cuadro 28. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación <i>in situ</i> a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la cianobacteria <i>N.muscorum</i> .	126
Cuadro 29. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación <i>ex situ</i> a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la cianobacteria <i>N. muscorum</i> .	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participación estimada de energía renovable del consumo total final de energía a nivel global (Fuente: REN21, 2024).	19
Figura 2. Diagrama esquemático del proceso para la producción de biodiésel usando microalgas. Para cada paso se muestran las técnicas básicas y/o más comúnmente utilizadas (Kiran et al., 2014).	28
Figura 3. Diagrama esquemático de un estanque tipo circuito 'raceway pond' (Melinda, 2013).	29
Figura 4. Diagrama esquemático de algunos FBRs. a) Tubular en conformación α ; b) Tubular horizontal; c) Tubular helicoidal d) Columna vertical de burbujeo; e) Reactor airlift; f) Paneles planos (Melinda, 2013).	30
Figura 5. Reacción general de transesterificación. R_1 , R_2 , R_3 y R' son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser homogéneos (álcalis: NaOH, KOH; ácidos: H_2SO_4 , HCl) o heterogéneos (lipasas, CaO y MgO) (Garibay-Hernández et al., 2009).	36
Figura 6. Desarrollo del sistema de cultivo de microorganismos fotosintéticos. A) Primer diseño a partir de frascos VIL-LAB® de 1600 ml de capacidad; a la derecha el frasco adaptado como fotobiorreactor con difusor metálico; B) Diseño final a partir de frascos KIMAX® de 1 L; a la derecha el frasco adaptado con difusor metálico y cultivo microalgal.	64

- Figura 7. Conformación del sistema de cultivo en estantes adaptados para el crecimiento de microorganismos de estudio. 65
- Figura 8. Perfiles de crecimiento, acumulación de lípidos y asimilación de nutrientes en medio Bold de *C. vulgaris*. (a) Curva de crecimiento; (b) Concentración de lípidos; (c) Consumo de N-NO₃; (d) Consumo de P-PO₄; y, (e) Porcentaje de lípidos. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes. 67
- Figura 9. Perfiles de crecimiento, acumulación de lípidos y asimilación de nutrientes en medio Bold de *N. oleoabundans*. (a) Curva de crecimiento; (b) Concentración de lípidos; (c) Consumo de N-NO₃; (d) Consumo de P-PO₄; y, (e) Porcentaje de lípidos. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes. 68
- Figura 10. Perfiles de crecimiento, acumulación de lípidos y asimilación de nutrientes en medio Bold de *N. muscorum*. (a) Curva de crecimiento; (b) Concentración de lípidos; (c) Consumo de N-NO₃; (d) Consumo de P-PO₄; y, (e) Porcentaje de lípidos. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes. 69
- Figura 11. Gráficas de línea ajustada para la regresión de la superficie de respuesta de *C. vulgaris*. 74

Figura 12. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de biomasa (CB) de *C. vulgaris* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol. 75

Figura 13. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de lípidos (CL) de *C. vulgaris* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol. 76

Figura 14. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la productividad de lípidos (PL) de *C. vulgaris* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol. 77

Figura 15. Gráficas de línea ajustada para la regresión de la superficie de respuesta de *N. oleoabundans*. 83

Figura 16. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de biomasa (CB) de *N. oleoabundans* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de

acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

84

Figura 17. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración productividad de biomasa (PB) de *N. oleoabundans* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

85

Figura 18. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre el porcentaje de lípidos (L) de *N. oleoabundans* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

86

Figura 19. Gráficas de línea ajustada para la regresión de la superficie de respuesta de *N. muscorum*.

93

Figura 20. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de biomasa (CB) de *N. muscorum* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 6 d; (b) glicerol y tiempo a 2.5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 2.5 g/L de glicerol.

94

Figura 21. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de lípidos (CL) de *N. muscorum* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 6 d; (b) glicerol y tiempo a 2.5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 2.5 g/L de glicerol.

95

Figura 22. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la productividad de biomasa (PB) de *N. muscorum* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 6 d; (b) glicerol y tiempo a 2.5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 2.5 g/L de glicerol.

96

Figura 23. Distribución porcentual de ácidos grasos en el biodiésel obtenido por transesterificación *in situ* de: a) *C. vulgaris*; b) *N. oleoabundans*; y, c) *N. muscorum*, cultivadas en sus respectivos medios control (izquierda) y en medios optimizados (derecha). Se muestran en las leyendas los resultados de los tres mayores constituyentes de cada tratamiento. Los datos son la media de tres experimentos independientes.

102

Figura 24. Distribución porcentual de lípidos de *C. vulgaris*, *N. oleoabundans* y *N. muscorum* en cultivo mixotrófico optimizado y sometidas a condiciones de estrés. Las diferencias estadísticamente significativas (*) corresponden a la comparación entre especies y entre los tratamientos con respecto al control. Se muestran resultados de tres experimentos

independientes. Las barras corresponden a una desviación estándar.

105

Figura 25. Distribución porcentual de los FAMES componentes del biodiésel de *C. vulgaris* obtenido por: (a) transesterificación *in situ*, y, (b) transesterificación *ex situ*. De izquierda a derecha en: medio optimizado, nitrógeno deficiente, nitrógeno limitante, salinidad baja y, salinidad alta.

109

Figura 26. Distribución porcentual de los FAMES componentes del biodiésel de *N. oleoabundans* obtenido por: (a) transesterificación *in situ*, y, (b) transesterificación *ex situ*. De izquierda a derecha en: medio optimizado, nitrógeno deficiente, nitrógeno limitante, salinidad baja y, salinidad alta.

113

Figura 27. Distribución porcentual de los FAMES componentes del biodiésel de *N. muscorum* obtenido por: (a) transesterificación *in situ*, y, (b) transesterificación *ex situ*. De izquierda a derecha en: medio optimizado, nitrógeno deficiente, nitrógeno limitante, salinidad baja y, salinidad alta.

117

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Producción *in situ* de biodiésel a partir de *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* y *Nostoc muscorum* cultivadas en condiciones mixotróficas

RESUMEN

Se diseñaron experimentos mediante la metodología de superficie de respuesta para encontrar las condiciones óptimas de cultivo mixotrófico, utilizando como fuente de carbono acetato de sodio y glicerol, y maximizar la respuesta de crecimiento de biomasa y concentración de lípidos. Para las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans* se realizó un diseño central compuesto, mientras que para la cianobacteria *Nostoc muscorum* se realizó un diseño Box-Behnken. Después de las corridas experimentales, tras el análisis de la regresión de superficie de respuesta, se realizaron los experimentos de validación de las respuestas significativas para cada especie de estudio y se obtuvieron los siguientes resultados. Para *C. vulgaris*, las condiciones óptimas de cultivo mixotrófico se establecieron en medio BBM adicionado con 10g/L de acetato de sodio y 0.74 g/L de glicerol con un tiempo de cultivo de 12 días; se obtuvo una concentración de biomasa de 1862.50 ± 81.97 mg/L y una concentración de lípidos de 548.20 ± 40.04 , lo que representó un aumento de 5.4 y 7.5 veces, respectivamente, de sus cultivos control, es decir sin adición de las fuentes de carbono. Para *N. oleoabundans*, las condiciones óptimas se establecieron en 7 g/L de glicerol y un tiempo de cultivo de 3 días, sin adición de acetato; se obtuvo una concentración de biomasa de 366.67 ± 76.38 mg/L y 80.10 % de contenido de lípidos, esto es un aumento de 2.5 y 2 veces, respectivamente, de sus cultivos control. En el caso de *N. muscorum*, las condiciones óptimas de cultivo fueron 0.78 g/L de acetato y 2.78 g/L de glicerol por 10 días, lo cual resultó en 588.89 ± 28.87 mg/L de concentración de biomasa y 48.53 ± 1.53 mg/L de concentración de lípidos, es decir hubo un aumento de 2.7 y 3.2 veces respectivamente, de sus cultivos control.

Posteriormente, se probó el efecto de la modificación del cultivo optimizado con nitrógeno deficiente o limitante, y con salinidad alta o baja, sobre el porcentaje de lípidos. Los resultados obtenidos mostraron que para *N. muscorum*, el porcentaje de lípidos aumentó en el tratamiento con nitrógeno deficiente ($p \leq 0.05$), mientras que los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*.

La biomasa procedente de estos tratamientos se sometió a transesterificación *in situ* para obtener biodiésel. Se realizó también la extracción de lípidos y posterior transesterificación (*ex situ*). Se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos componentes del biodiésel mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Los ácidos grasos encontrados en su mayoría corresponden a una longitud de C16 a C18, reconocidos por ser adecuados para la producción de biodiésel, con una distribución variada por el efecto de la composición de los medios de cultivo. Con los resultados obtenidos fue posible estimar las propiedades del biodiésel mediante la aplicación de ecuaciones empíricas. Los resultados obtenidos se compararon con los estándares establecidos en la norma europea EN14214. El biodiésel obtenido a partir de *C. vulgaris* por transesterificación *in situ* en medio optimizado con nitrógeno deficiente y salinidad baja mostró los mejores parámetros de calidad, cumpliendo con todos los límites establecidos en dicha norma para las propiedades estimadas en este estudio.

ABSTRACT

Experiments were designed using the response surface methodology to find the optimal conditions for mixotrophic culture, using sodium acetate and glycerol as a carbon source, and maximize the biomass growth response and lipid concentration. A composite central design was made for the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*, while a Box-Behnken design was performed for the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. After the experimental runs, after the analysis of the response surface regression, the validation experiments of the significant responses were carried out for each study species and the following results were obtained. For *C. vulgaris*, the optimal mixotrophic culture conditions were established in BBM medium added with 10 g/L of sodium acetate and 0.74 g/L of glycerol with a culture time of 12 days; a biomass concentration of 1862.50 ± 81.97 mg/L and a lipid concentration of 548.20 ± 40.04 were obtained, which represented an increase of 5.4 and 7.5 times, respectively, of its control culture, that is, without the addition of carbon sources. For *N. oleoabundans*, the optimal conditions were established at 7 g/L glycerol and a culture time of 3 days, without the addition of acetate; a biomass concentration of 366.67 ± 76.38 mg/L and 80.10 % lipid content was obtained, this is an increase of 2.5 and 2 times, respectively, of its control culture. In the case of *N. muscorum*, the optimal culture conditions were 0.78 g/L of acetate and 2.78 g/L of glycerol for 10 days, which resulted in 588.89 ± 28.87 mg/L of biomass concentration and 48.53 ± 1.53 mg/L of lipid concentration, that is, there was an increase of 2.7 and 3.2 times respectively. of its control culture.

Subsequently, the effect of modifying the optimized culture with deficient or limiting nitrogen, and with high or low salinity, on the percentage of lipids was tested. The results obtained showed that for *N. muscorum*, the percentage of lipids increased in the treatment with deficient nitrogen ($p \leq 0.05$), while the treatments did not have statistically significant differences in *C. vulgaris* and *N. oleoabundans*.

The biomass from these treatments was subjected to transesterification *in situ* to obtain biodiésel. Lipid extraction and subsequent transesterification (*ex situ*) were also performed. The fatty acids that are components of biodiésel were identified and quantified by gas chromatography-mass spectrometry. Most of the fatty acids found corresponded to a length of C16 to C18, recognized as being suitable for the production of biodiésel, with a varied distribution due to the effect of the composition of the culture media.

With the results obtained, it was possible to estimate the properties of biodiésel by applying empirical equations. The results obtained were compared with the standards established in the European standard EN14214. The biodiésel obtained from *C. vulgaris* by *in situ* transesterification in an optimized medium with deficient nitrogen and low salinity showed the best quality parameters, complying with all the limits established in said standard for the properties estimated in this study.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la urbanización e industrialización han provocado una extracción y consumo substanciales de los combustibles fósiles tales como el carbón, petróleo y gas natural. El uso de combustibles fósiles como fuentes de energía plantea graves problemas ambientales debido a la emisión de contaminantes gaseosos como dióxido de carbono (CO_2), dióxido de nitrógeno (NO_2), dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), entre otros, después de la combustión (Rastogi *et al.*, 2017).

Además, las actuales reservas mundiales de petróleo superan la demanda, pero la producción máxima se proyecta en las próximas dos décadas e incluso algunos expertos argumentan que el mundo ya está en su pico de producción; aunque el período pico exacto todavía es discutible, generalmente se acepta ahora que sucederá en el futuro cercano, y que en un escenario posterior al pico, la brecha entre la capacidad de oferta y la demanda podría alcanzar hasta el 20% en 5 años en función del aumento actual tanto de la población como de la demanda de energía. Por lo tanto, la transición energética es inevitable (Ussiri y Lal, 2017). Lo anterior ha impulsado el interés en la búsqueda de fuentes alternativas de energía renovable.

La energía renovable es cualquier energía que se repone mediante procesos naturales a una velocidad que iguala o excede su tasa de uso; se obtiene de los flujos continuos o repetitivos de energía que ocurren en el entorno natural (Ussiri y Lal, 2017).

En la figura 1 se puede apreciar que las energías renovables modernas representaron cerca del 13 % del total de energía consumido a nivel global, y dentro de estas energías, los biocombustibles para el transporte representaron el 1 % (REN21, 2024).

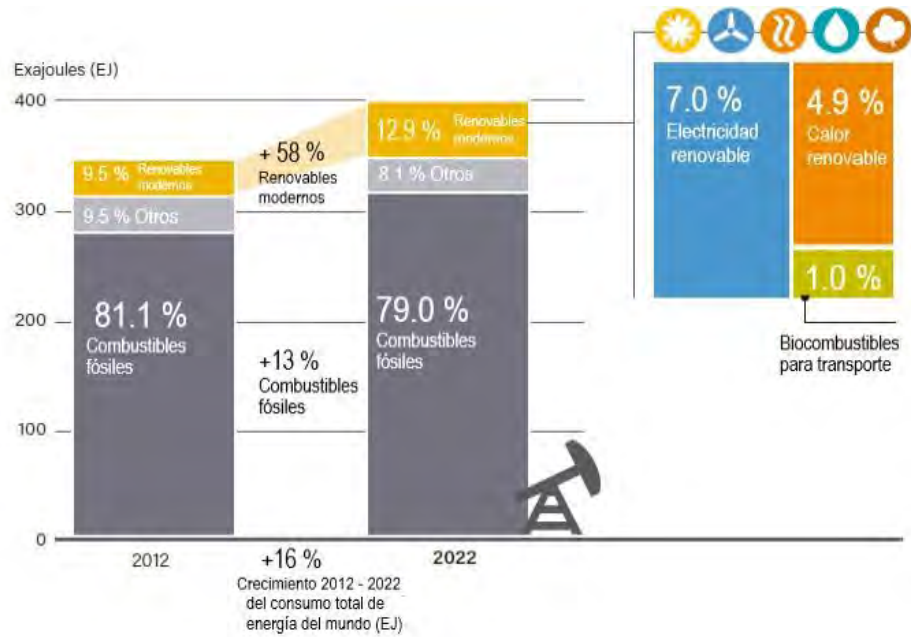


Figura 1. Participación estimada de energía renovable del consumo total final de energía a nivel global (Fuente: REN21, 2024)

Entre las fuentes de energía renovables, los biocombustibles son considerados como una opción factible para lograr el objetivo de reemplazar los combustibles fósiles a corto plazo (Shuba y Kifle, 2018).

1.1. Biocombustibles

Los biocombustibles son combustibles que contienen energía a partir de la fijación reciente de carbono, *i. e.*, organismos vivos; pueden producirse a partir de almidón, aceites vegetales, grasas animales, biomasa residual o biomasa de algas, las cuales son no tóxicas, biodegradables y renovables (Shuba y Kifle, 2018).

Las ventajas de los biocombustibles sobre los combustibles derivados del petróleo son la no toxicidad, la biodegradabilidad así como la reducción a niveles muy bajos de las emisiones de dióxido de carbono (Abdullah *et al.*, 2024).

Según los tipos de materia prima utilizados para producirlos, se clasifican en biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de biocombustibles: fuente de materia prima, proceso y productos obtenidos (Tomado de Dutta *et al.*, 2014).

Generación	Materia prima	Tecnología de procesamiento	Productos obtenidos
Primera	Semillas oleaginosas comestibles, cultivos de alimentos, grasas animales	Esterificación y transesterificación de aceites y fermentación de azúcares, procesos termoquímicos.	Biodiésel, bioetanol, biobutanol
Segunda	Semillas oleaginosas no comestibles, aceite de cocina usado, materiales lignocelulósicos de alimentación: paja de cereales, bagazo de caña, residuos forestales	Pretratamiento físico, químico y biológico, procesos termoquímicos	Bioetanol, biobutanol, biodiésel, syngas
Tercera	Algas	Cultivo de algas, cosecha, extracción de lípidos, transesterificación o fermentación, o procesos termoquímicos	Biodiésel, bioetanol, biobutanol, syngas, biohidrógeno
Cuarta	Algas y otros microorganismos	Ingeniería metabólica de algas, cultivo, cosecha, fermentación, o extracción de lípidos, transesterificación, o procesos termoquímicos	Los mismos que en la tercera generación

1.2. Biodiésel

El término “Biodiésel” se introdujo en Estados Unidos durante 1992 por el Comité Nacional del Biodiésel o *National Biodiésel Board* (NBB, por sus siglas en inglés) que ha sido pionero en la comercialización de biodiésel en Estados Unidos (Singh y Singh, 2010).

Químicamente, el biodiésel es una mezcla de ésteres alquílicos (generalmente metílicos) de ácidos grasos obtenida por transesterificación (reacción de intercambio de éster) de aceites vegetales o grasas animales (Mata *et al.*, 2010). Los aceites y grasas son principalmente sustancias hidrófobas; las que están formadas por un mol de glicerol y tres moles de ácidos grasos son conocidos comúnmente como triglicéridos. Los aceites y grasas de diferentes fuentes tienen diferentes composiciones de ácidos grasos, ya que varían en la longitud de su cadena de carbonos y en la cantidad de enlaces insaturados que contienen (Singh y Singh, 2010).

En contraste con el diésel de petróleo, el biodiésel ofrece varias ventajas: a) es una fuente de energía renovable y biodegradable (se degrada cuatro veces más rápido que el diésel fósil); b) produce menos emisiones indeseables durante su combustión a causa de su estado oxigenado, siendo éstas por ende menos nocivas; c), posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor; d) es un material seguro para su transporte, almacenamiento y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (100 - 170°C); e) puede utilizar la infraestructura actual de almacenamiento y distribución para el diésel de petróleo; y, d) por su similitud de las propiedades físicas y químicas con las del diésel fósil (cuadro 2), su uso no requiere de modificación alguna en los motores diésel convencionales (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Especificaciones de las propiedades del biodiésel y del diesel de petróleo (Modificado de Joshi *et al.*, 2017).

Especificación	Unidades	Biodiésel (Norma Europea EN 14214:2003)	Diésel (Norma Europea EN 590:1999)
Densidad 15°C	g/cm ³	0.86 – 0.90	0.82 – 0.845
Viscosidad 40°C	mm ² /s	3.5 – 5.0	2.0 – 4.5

Destilación	% @ °C		85%,350°C– 95%,360°C
Punto de inflamabilidad	°C	120 mín.	55 mín.
POFF	°C	Específico por país	Específico por país
Azufre	mg/kg	10 máx.	350 máx.
Residuo carbonoso	% masa	0.3 máx.	0.3 máx.
(10% destilados)			
Cenizas sulfatadas	% masa	0.02 máx.	
Cenizas de óxidos	% masa		0.1 máx.
Agua	mg/kg	500 máx.	200 máx.
Contaminación total	mg/kg	24 máx.	24 máx.
Corrosión al cobre máx.	3 h/50°C	1	1
Estabilidad a la oxidación	h; °C	8 h mín.	N/A
Número de cetano		51 mín.	51 mín.
Índice de acidez	mgKOH/g	0.5 máx.	N/A
Metanol	% masa	0.20 máx.	N/A
Contenido de ésteres	% masa	96.5 mín.	N/A
Monoglicéridos	% masa		N/A
Diglicéridos	% masa		N/A
Triglicéridos	% masa		N/A
Glicerol libre	% masa		N/A
Glicerol total	% masa		N/A
Índice de yodo			N/A
EM del ácido linolénico	% masa		N/A
C(x:4) y ésteres insaturados mayores	% masa	12 máx.	N/A
Fósforo	mg/kg		N/A
Alcalinidad	mg/kg		N/A
Metales Gp I (Na, K)	mg/kg	5 máx.	N/A

Metales Gp II (Ca, Mg)	mg/kg	5 máx.	N/A
HAPs	% masa		11 máx.
Lubricidad	μm a 60°C		460 máx.

POFF: Punto de obstrucción de filtros en frío

EM: éster metílico

HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

N/A: no aplica

Las principales materias primas para la producción de biodiésel son los aceites de la palma, la soya y la colza (canola), con alguna participación de grasa animal y aceite de girasol. Por regla general, cada país utiliza su materia prima más abundante para producir biodiésel, de modo que los Estados Unidos, Brasil y Argentina dependen en gran medida del aceite de soya, Indonesia y Malasia usan aceite de palma, y la Unión Europea cuenta con colza; la grasa animal también constituye una importante fuente de materia prima para la producción de biodiésel, siendo la principal fuente en China (grasa de cerdo) y en Brasil, alrededor del 20% del biodiésel se obtiene a partir de grasa animal (principalmente sebo) (Gazzoni y Dall’Agnol, 2016).

La producción mundial de biodiésel al año 2016, fue de aproximadamente 31 mil millones de litros. Actualmente, una de las mayores desventajas es que la producción se basa en materias primas de cultivos convencionales para el consumo humano y la alimentación animal, por lo tanto, puede que no sea factible satisfacer la demanda requerida para la transición energética (Ussiri y Lal, 2017).

Por otro lado, la motivación detrás de los biocombustibles de segunda generación fue utilizar residuos de desecho (desperdicio de la industria de procesado de madera, cáscaras de fruta, etc.) y tierras áridas para el crecimiento de la biomasa, o bien, ser producidos de plantas oleaginosas no comestibles, las cuales podrían crecer incluso en áreas marginales y sobrevivir en agua salada (e. g. *Jatropha*, *Pongamia*); sin embargo, su sostenibilidad también cayó bajo

escrutinio debido a su competencia con cultivos alimentarios por la tierra fértil y la deforestación. Tales limitaciones enfocaron los combustibles de segunda generación al uso de materiales lignocelulósicos (Kiran *et al.*, 2014). Esto representa un desafío pues es necesario descomponer la lignocelulosa en fragmentos más pequeños a través de diversos métodos, tales como los enzimáticos, térmicos y uso de hongos como pretratamiento (Lackner, 2017).

Una manera de superar los inconvenientes anteriormente mencionados, es el uso de otra fuente prometedora de materia prima: las algas (biocombustibles de tercera generación). La biomasa algal puede ser usada de diversas maneras: a) directamente como biocombustible sólido para generar calor, vapor y electricidad; b) convertida a biocombustibles gaseosos, tales como biogás o biohidrógeno; c) fermentada si presenta alto contenido de almidón para producir biocombustibles líquidos tales como bioetanol y biobutanol; o bien, d) convertida a diésel, gasolina y combustible para aviones si presenta altos contenidos de aceites (Ghasemi *et al.*, 2012).

Las algas consisten en un grupo de organismos cuyos miembros comparten las propiedades de fotosíntesis oxigénica; las especies de algas pueden variar desde células simples de tamaño menor a 2 μm , o picoplancton, hasta colonias multicelulares o incluso estructuras más complejas como hojas de 50 – 60 m de largo, como las algas marinas gigantes (Bassi *et al.*, 2014).

En la producción de biocombustibles, el término “Algas” comprende a las microalgas, cianobacterias y macroalgas (algas marinas), aunque cabe resaltar que las cianobacterias no son algas verdaderas, ya que son procariontas mientras que las otras son eucariotas (Lackner, 2017).

1.3. ¿Por qué utilizar algas para producir biodiésel?

En general, las microalgas son microorganismos fotosintéticos que se encuentran en hábitats tanto marinos como dulceacuícolas; han sido clasificadas basadas en varias características tales como pigmentación, productos de almacenamiento sintéticos, los arreglos de las membranas fotosintéticas, y otras características morfológicas (Rajkumar *et al.*, 2014).

Las consideraciones que hacen que las algas sean atractivas para la producción de biocombustibles de tercera generación son las siguientes: 1) Alta productividad por km² (cuadro 3); 2) son materias primas no alimentarias; 3) uso de tierras no productivas ni cultivables; 4) utilización de una amplia variedad de fuentes de agua (fresca, salobre, salina, marina, aguas residuales); 5) producción de biocombustibles y co-productos valiosos; y 6) potencial de reciclar CO₂ y otros nutrientes en corrientes de desechos (Lackner, 2017).

Cuadro 3. Comparación de las eficiencias de producción de biodiésel a partir de aceites vegetales y algales (Lackner, 2017).

Fuente	Biodiésel (L/ha/año)	Área para producir la demanda global de aceite	Área requerida como % de la masa terrestre global	Área como % de masa de tierra cultivable
Algodón	325	15 002	100.7	756.9
Soya	446	10 932	73.4	551.6
Semilla de mostaza	572	8 594	57.2	430.1
Girasol	952	5 121	34.4	258.4
Colza	1 190	4 097	27.5	206.7
Jatropha	1 892	2 577	17.3	130
Palma aceitera	5 950	819	5.5	41.3
Algas (10 g/m ² día con 30% TAG)	12 000	406	2.7	20.5
Algas (10 g/m ² día con 50% TAG)	98 500	49	0.3	2.5

TAG: triacilgliceroles

Por otro lado, las cianobacterias pertenecen a un *phylum* de bacterias que obtienen su energía mediante la fotosíntesis (Lackner, 2017). Las cianobacterias comprenden a los organismos fotoautotróficos más antiguos de la tierra y presentan características importantes como altos niveles fotosintéticos y tasas de crecimiento celular, con requisitos nutricionales simples que los ubican como candidatas para aplicaciones biotecnológicas (Grewe y Pulz, 2012; Sarkar y Shimizu, 2015). Entre los productos obtenidos de cianobacterias figuran metabolitos secundarios,

vitaminas, toxinas, cosméticos, colorantes de grado alimenticio y sustancias terapéuticas (Zutshi y Fatma, 2015).

Las cianobacterias también pueden ser utilizadas como fuente de biocombustibles; aun cuando contienen ligeramente menos triacilgliceroles que las algas, son una fuente rica de energía que los ubica como materia factible para la producción de biodiésel (Abideen *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016). Algunas cianobacterias productoras de biocombustibles son *Nostoc* sp., *Phormidium angustissimum* TISTR 8979, *Spirulina fusiformis*, *Synechococcus* sp., y *Lyngbya* sp. (Zutshi y Fatma, 2015).

1.4. ¿Cómo se produce el biodiésel a partir de biomasa algal?

Todos los procesos existentes para la producción de biodiésel a partir de biomasa algal incluyen una unidad de producción donde se cultivan las células, seguido de la separación de las células del medio de crecimiento y la subsecuente extracción de lípidos. Después, el biodiésel u otros biocombustibles se producen en una forma parecida a los procesos y tecnologías existentes utilizados para otras materias primas de biocombustibles (Mata *et al.*, 2010). La figura 2 muestra el proceso general de producción de biodiésel.

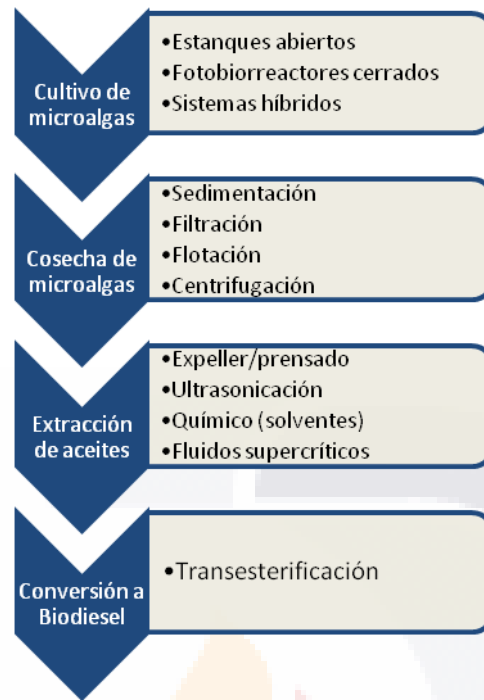


Figura 2. Diagrama esquemático del proceso para la producción de biodiésel usando microalgas. Para cada paso se muestran las técnicas básicas y/o más comúnmente utilizadas (Kiran *et al.*, 2014).

El punto de partida para el proceso de producción de biodiésel es la identificación/selección de cepas de algas que posean en general altas cantidades de lípidos totales, y lípidos neutros en particular, o bien, que tengan la capacidad de acumularlos rápidamente bajo diversas condiciones de cultivo. Al correlacionar algunas cepas cultivadas individualmente en el laboratorio, con sus contenidos de aceite y las condiciones adecuadas de crecimiento, se puede desarrollar una herramienta predictiva para seleccionar cepas óptimas para la producción de biocombustibles (Behera y Varma, 2019).

Existen varios sistemas para el cultivo de microalgas y cianobacterias: a) abiertos (por ejemplo, tipo circuito, figura 3), b) cerrados (por ejemplo, fotobiorreactores), así como, c) híbridos (Behera y Varma, 2019).

Las ventajas inherentes a los cultivos abiertos radican en su sencillez y su bajo costo de inversión (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

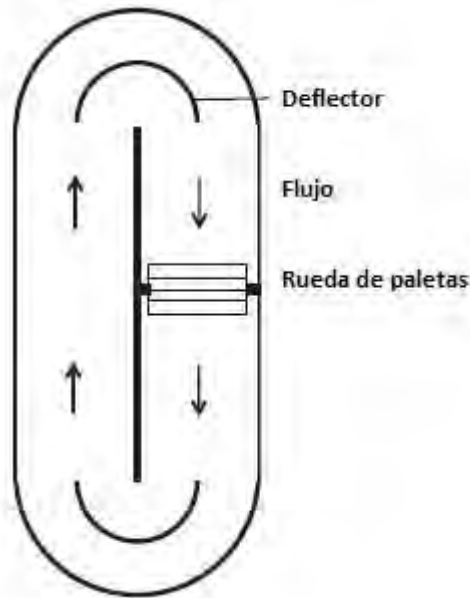


Figura 3. Diagrama esquemático de un estanque tipo circuito 'raceway pond' (Melinda, 2013).

Los sistemas cerrados, en contraste con los abiertos, ofrecen numerosas ventajas tales como pérdidas mínimas de CO₂, riesgo reducido de contaminación, control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, menores requerimientos de superficie, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción (2 a 4 semanas) y productividades considerablemente superiores (5 a 13 veces). Los fotobiorreactores (FBRs) cerrados, con el propósito de coleccionar la mayor cuantía posible de energía solar por unidad de superficie, presentan configuraciones diversas, tubulares (vertical, horizontal, helicoidal, conformación α , paneles planos y columnas de burbujeo, principalmente (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

Los FBRs más populares son los siguientes: sistemas tubulares; FBRs helicoidales; sistemas de bolsas plásticas; FBRs piramidales; FBRs airlift; FBRs de columna; FBRs de columna de burbujeo; FBRs de columna vertical; FBRs de paneles planos; FBRs de tanque agitado; tanques rectangulares; biorreactores inmobilizados; sistemas híbridos (Ghasemi *et al.*, 2012). La figura 4 muestra los diagramas esquemáticos de algunos de los FBRs anteriormente mencionados.

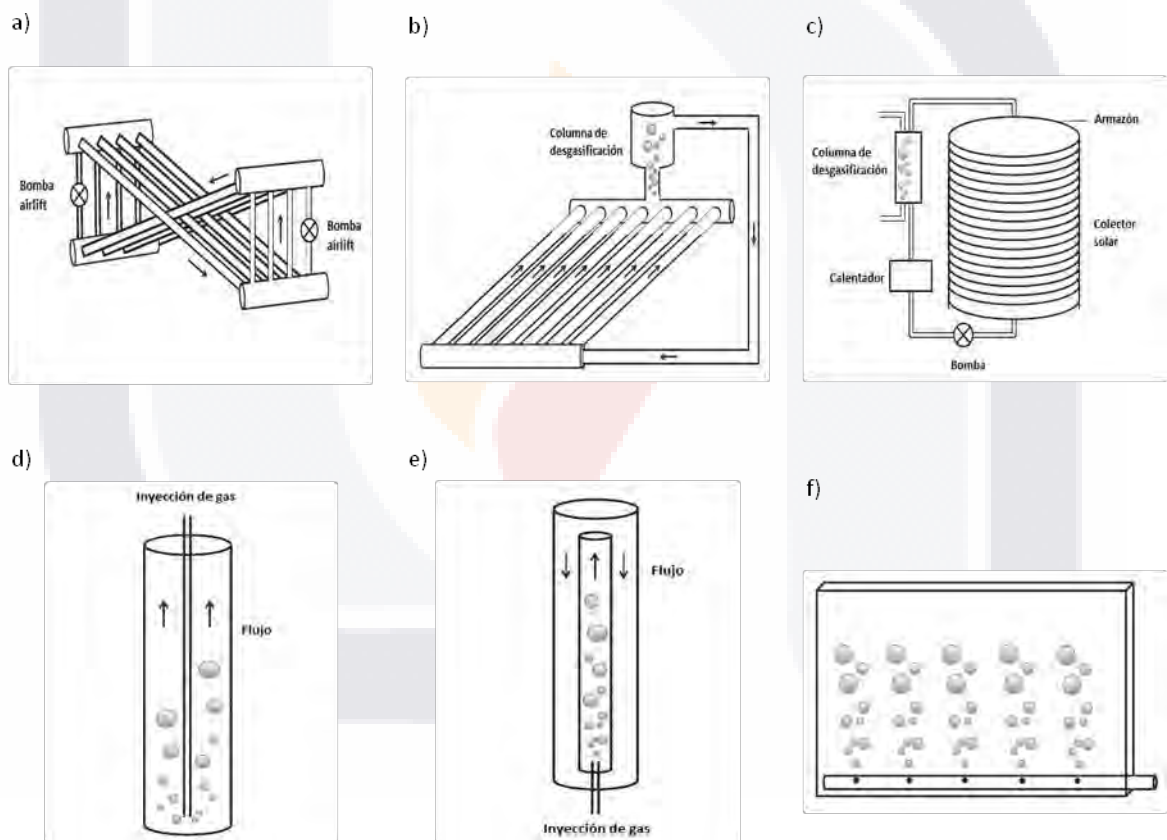


Figura 4. Diagrama esquemático de algunos FBRs. a) Tubular en conformación α ; b) Tubular horizontal; c) Tubular helicoidal d) Columna vertical de burbujeo; e) Reactor airlift; f) Paneles planos (Melinda, 2013).

Los sistemas híbridos han sido propuestos como una alternativa económica para la producción de biodiésel microalgal a gran escala. En términos generales, tales sistemas consisten en una etapa inicial de producción de biomasa en fotobiorreactores cerrados, en la cual los microorganismos son mantenidos en crecimiento continuo bajo condiciones de suficiencia de nutrientes, etapa que es seguida por una fase de acumulación de producto (lípidos) en estanques abiertos, inducida mediante la deficiencia de nutrientes (Garibay-Hernández, 2009).

Además del sistema de cultivo, las características del crecimiento y composición de la biomasa algal dependerán en gran medida de la condición del cultivo. Las características generales de los diferentes modos de cultivo se enlistan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Consideraciones y requerimientos para el cultivo algal en diferentes modos (Bassi et al., 2014).

Modo de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Densidad celular	Escalamiento	Costo	Cuestiones asociadas con el escalamiento
Fototrófico	Luz	Inorgánica	Baja	Estanque abierto o FBR	Bajo	Baja densidad celular Alto costo de condensación
Heterotrófico	Orgánica	Orgánica	Alta	Biorreactor convencional	Medio	Contaminación Alto costo del sustrato
Mixotrófico	Luz y orgánica	Inorgánica y orgánica	Medio	FBR cerrado	Alto	Contaminación Alto costo de equipamiento Alto costo del sustrato

Con los biocombustibles siendo un producto de bajo valor, el costo de producción de la materia prima debe reducirse al mínimo para que sea económicamente viable y competitivo a gran escala. El cultivo mixotrófico de microalgas, donde el crecimiento fotosintético es adicionado de residuos industriales y agrícolas y glicerol de la producción de biodiésel, podría reducir el costo de la producción de biomasa microalgal. El cultivo mixotrófico ha demostrado también mejorar la velocidad de crecimiento y producción lipídica resultando en un ciclo de crecimiento más corto y productividades biomásica y moléculas de reserva aumentadas. La composición bioquímica de la biomasa algal es enormemente dependiente de las condiciones de cultivo; las microalgas mixotróficas han demostrado tener más altas productividades de lípidos, almidón y proteínas que las microalgas crecidas bajo condiciones fotoautotróficas. Además, cuando se compara con las condiciones de crecimiento fotoautotróficas, el cultivo mixotrófico es asociado con un costo energético bajo debido a sus relativamente pocos requerimientos de intensidad de luz (Adesanya *et al.*, 2014).

Una vez que la biomasa de microalgas ha sido producida en alguno de los sistemas descritos, inicia la etapa de cosecha o recolección, cuyo propósito es el de remover el agua y concentrar las células microalgales para su posterior procesamiento (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

Existen cuatro métodos básicos de cosecha de microalgas: sedimentación, filtración, flotación y centrifugación (Saharan *et al.*, 2013). Las técnicas de procesamiento dependen de las propiedades de la especie de microalga cultivada (morfologías particulares, presencia de vacuolas gaseosas, etc.), ya que algunas presentan características que facilitan su recolección. La filtración resulta conveniente para especies microalgales de forma filamentosas o capaces de formar colonias. La aplicación de la sedimentación o de la centrifugación podría ser factible en microalgas con diámetros mayores a los 5 μm y paredes celulares relativamente gruesas. A pesar del frecuente empleo de la sedimentación en la acuicultura, su principal desventaja es la larga duración de esta operación. Por su parte, la

centrifugación sólo resulta conveniente para productos de alto valor agregado, ya que implica altos costos y demanda un elevado consumo de energía. La floculación consiste en la aglomeración y posterior sedimentación o flotación de la biomasa de microalgas; esta puede ser inducida de diversos modos. La floculación mediante la adición de sales inorgánicas (alúmina, cloruro férrico, óxido de calcio) no es recomendada por su alto costo y por contaminar la biomasa, de manera tal que ésta no puede ser utilizada posteriormente como alimento. El uso de polímeros orgánicos catiónicos como floculantes no presenta estos inconvenientes. Sin embargo, su efectividad puede ser disminuida en aguas salobres como consecuencia de la elevada fuerza iónica que las caracteriza. Por su parte, la biofloculación es un procedimiento alternativo de cosecha que consiste en el uso de especies de microalgas que naturalmente floculan o cuya aglomeración puede ser inducida mediante la aplicación de condiciones de estrés tales como cambios de pH, temperaturas extremas y restricción de nutrientes. No obstante, la modificación de las condiciones de cultivo puede alterar la composición bioquímica de la microalga y por tanto el rendimiento lipídico. Finalmente, se ha propuesto la floculación microbiana o co-biofloculación, procedimiento en el cual se adicionan microorganismos autofloculantes (tales como levaduras) al cultivo microalgal, de manera tal que se promueve la aglomeración conjunta de éstos con la biomasa que se desea cosechar (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

Después de la cosecha, la biomasa algal requiere un procesamiento rápido con el fin de minimizar el deterioro que podría resultar en la reducción del contenido de lípidos (Saharan *et al.*, 2013).

Los lípidos algales son químicamente análogos a los lípidos de semillas oleaginosas derivadas de plantas; los métodos más comunes de extracción de lípidos son el prensado expeller, técnicas de ultrasonido, extracción con solventes y extracción con fluidos supercríticos (Rajkumar *et al.*, 2014).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El prensado expeller es un método mecánico para la extracción de aceites usando presión. La biomasa microalgal necesita ser secada a alta presión para el óptimo desempeño del proceso (Kiran *et al.*, 2014).

La extracción ultrasónica utiliza intensas ondas ultrasónicas para crear pequeñas burbujas de cavitación. El colapso de esas burbujas cerca de las paredes celulares crea ondas de choque, lo que rompe las paredes celulares, de este modo se libera el contenido en el disolvente (Kiran *et al.*, 2014).

La extracción química involucra el uso de solventes no polares (dietil éter o cloroformo) para extraer los lípidos neutrales o de almacenamiento. Sin embargo, los lípidos asociados con las membranas (polares por naturaleza) requieren solventes polares (etanol o metanol) para la ruptura de las fuerzas electrostáticas. El método Soxhlet es el más comúnmente utilizado para la extracción de aceites de la biomasa microalgal seca, en el cual solventes orgánicos tales como hexano, benceno, ciclohexano, acetona y cloroformo son usados en lavados repetidos de la microalga bajo reflujo en un equipo especial llamado extractor Soxhlet. Este método ofrece varias ventajas, como bajo costo y menor uso de solvente. Las principales limitantes asociadas con la extracción química son la extracción pobre de lípidos polares, proceso largo y peligros de los solventes en ebullición (Kiran *et al.*, 2014).

En la extracción con fluidos supercríticos, se utilizan altas presiones y temperaturas para la ruptura de las células. El dióxido de carbono es el solvente supercrítico más comúnmente usado debido a que no conduce a la contaminación o degradación térmica de los compuestos. En este proceso, el CO₂ es comprimido más allá de su estado supercrítico (31°C, 74 bar). El CO₂ en este estado es puesto en contacto con las microalgas y penetra dentro de los poros microalgales debido a su alta tasa de difusión. Cuando el dióxido de carbono es despresurizado, las sustancias de interés se colectan. Este método tiene varias ventajas, tales como la capacidad de uso directamente en la biomasa residual como alimento animal o como biomasa para digestión anaeróbica y residuo de desecho como fertilizantes y

compostas. Los principales factores limitantes en la utilización de este proceso son el alto capital de inversión y los requerimientos para la alta presión (Kiran *et al.*, 2014).

Después de la extracción de lípidos, es necesario un proceso de conversión para producir biodiésel ya que la viscosidad de los aceites microalgales extraídos es demasiado alta para que puedan ser usados directamente como combustible. Si los aceites con alta viscosidad fueran utilizados en los motores, éstos rápidamente fallarían debido a la acumulación de sedimentos del aceite. Por consiguiente, para producir un biocombustible adecuado que ofrezca una operación fluida en el motor, la viscosidad del aceite microalgal debe ser reducida (Kim *et al.*, 2013).

Cuatro técnicas están disponibles para mejorar las propiedades de los biocombustibles: la dilución, microemulsión, pirólisis y transesterificación. De estos, la transesterificación es la más ampliamente estudiada (Kiran *et al.*, 2014). La aplicación de las tres primeras alternativas en motores diésel es impráctica e insatisfactoria, ya que ocasiona problemas tales como la obstrucción de los inyectores, la formación de depósitos de carbono, la combustión incompleta, el golpeteo del motor, el desgaste excesivo del mismo, el daño del lubricante y, en el caso específico de la pirólisis, la eliminación de los beneficios ambientales inherentes al uso de combustibles oxigenados (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

La transesterificación convierte los lípidos microalgales puros y viscosos (triacilglicerolos/ácidos grasos libres) a ésteres alquílicos de menor peso molecular (figura 5). El grupo alcoxi de un compuesto éster es intercambiado por un alcohol (alcoholólisis), ácidos carboxílicos (acidólisis) o un éster (interesterificación). Solamente la alcoholólisis y la interesterificación han ganado importancia y son utilizados para producir biodiésel. Por lo tanto, es una reacción entre el aceite (triglicérido) y un alcohol de cadena corta, en presencia de un catalizador (Pragya y Sahoo, 2013).

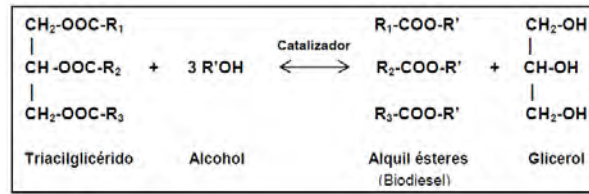


Figura 5. Reacción general de transesterificación. R₁, R₂, R₃ y R´ son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser homogéneos (álcalis: NaOH, KOH; ácidos: H₂SO₄, HCl) o heterogéneos (lipasas, CaO y MgO) (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

Debido a que el alcohol más comúnmente usado es metanol, los productos finales son conocidos como Metil Esteres de Ácidos Grasos (FAMES –*Fatty Acid Methyl Esters*- por sus siglas en inglés). La reacción de transesterificación puede usar un catalizador homogéneo o heterogéneo. Los catalizadores homogéneos pueden alcanzar altas conversiones mientras que los heterogéneos solo dan conversiones moderadas; esto puede ser debido al hecho de que los catalizadores homogéneos pueden disolverse en el volumen líquido mientras que los heterogéneos no, produciendo limitaciones en la transferencia de masa. Los catalizadores homogéneos o heterogéneos pueden ser ácidos o alcalinos. Ejemplos de catalizadores homogéneos son el ácido sulfúrico o clorhídrico (catalizadores ácidos). Ejemplos de catalizadores heterogéneos son el tamiz molecular zeolita-A o la zirconia sulfatada (ácidos); y los aluminatos u óxidos de zinc (Velasquez-Orta *et al.*, 2013).

1.5. Transesterificación *in situ*

Convencionalmente, los lípidos son extraídos de las microalgas antes de la transesterificación; alternativamente la transesterificación *in situ* puede realizarse por contacto directamente de la biomasa con el alcohol y catalizador requeridos (Velasquez-Orta *et al.*, 2013). Es un método de un solo paso en el cual tanto la extracción como la transesterificación de los aceites algales se llevan a cabo simultáneamente en el reactor. Esto no sólo reduce las operaciones unitarias, sino que también disminuye el costo final del biodiésel mediante la reducción del costo

del proceso general. También consume mucho menos tiempo que el proceso convencional de dos pasos (Pragya *et al.*, 2013).

Después de que la biomasa es secada, para prevenir la formación indeseada de jabón durante la transesterificación, se tritura en pequeñas partículas sólidas. El metanol actúa como extractante así como reactante. Los dos procesos simultáneos de extracción y transesterificación, demandan solventes con diferentes polaridades. Por consiguiente, el metanol se mezcla con un solvente no polar en una relación adecuada (Pragya *et al.*, 2013).

Los parámetros más importantes que influyen en el proceso son los siguientes (Hidalgo *et al.*, 2013):

- a) Relación molar alcohol/lípidos. Normalmente las relaciones molares usadas para la transesterificación directa son mucho más elevadas que los valores estequiométricos para favorecer la formación de productos. El alcohol en exceso desempeña un papel también como solvente de extracción, proveyendo acceso de alcohol y catalizador al sustrato; el metanol en exceso es responsable de romper los enlaces entre la glicerina y los ácidos grasos, siendo su presencia esencial en el proceso. Sin embargo, un exceso en el metanol elevado puede provocar una disminución en el rendimiento en la separación entre las fases éster y glicerina.
- b) Dosis del catalizador. La producción de biodiésel por transesterificación directa ha sido realizada principalmente usando catálisis ácida debido al alto contenido de ácidos grasos libres. Aquí, el ácido sulfúrico ha sido el catalizador más usado ya que convierte tanto los triacilglicéridos como los ácidos grasos libres en biodiésel. Respecto a la dosis, se han reportado valores entre 20 y 100 % (basados en el contenido de lípidos en la biomasa).
- c) Temperatura y tiempo de reacción. Estudios previos han demostrado que cuando se incrementa la temperatura el tiempo necesario para alcanzar el máximo rendimiento de biodiésel disminuye. Sin embargo, altas temperaturas pueden también producir una posible degradación de los lípidos.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- d) Co-solventes. El uso de co-solventes podría mejorar el funcionamiento de los sistemas de transesterificación directa. De hecho, un co-solvente adecuado puede mejorar la transferencia de masa y acelerar la extracción de lípidos, incluso reducir el tiempo de extracción.
 - e) Contenido de agua de la biomasa. Un alto contenido de agua en la biomasa tiene efectos negativos en el rendimiento de conversión a biodiésel ya que se promueven las reacciones de hidrólisis de lípidos con la formación de ácidos grasos. Una alternativa para superar el efecto del contenido de agua en el proceso de transesterificación directa es el aumento en la dosis de metanol y el uso de procesos supercríticos.

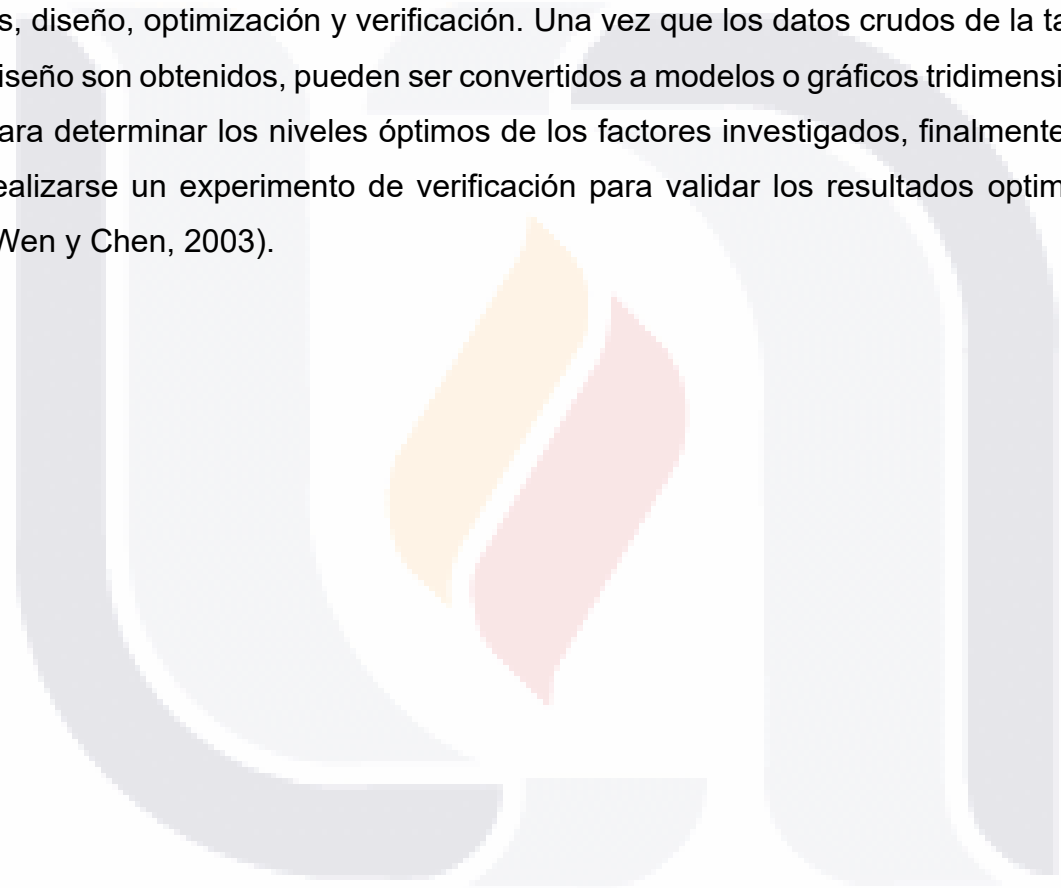
Las fuerzas mecánicas pueden aumentar los rendimientos obtenidos durante la transesterificación *in situ*. Aunque los catalizadores mecánicos no facilitan directamente la reacción de transesterificación, mejoran el rendimiento final mediante el aumento en la penetración de los solventes en las células para extraer los lípidos. Ejemplos de catálisis mecánica son la radiación microondas, radiación ultrasónica (sonicación) y el autoclaveado, los cuales mejoran parámetros tales como temperatura y tiempo de reacción (Kim *et al.*, 2013). El proceso de transesterificación asistida con microondas requiere una relación alga seca-metanol adecuada para favorecer la transesterificación y extracción simultáneas. La tecnología ultrasónica provee suficiente energía de activación para iniciar la reacción de transesterificación. Ambas tecnologías pueden acelerar la ruptura de las células microalgales, y como resultado se observa una liberación más fácil de aceites (Hidalgo *et al.*, 2013).

1.6. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La MSR es una técnica para determinar la configuración del factor de diseño para mejorar u optimizar el rendimiento o la respuesta de un proceso o producto. Combina el diseño de experimentos, el análisis de regresión y los métodos de optimización en una estrategia de propósito general para optimizar el valor esperado

de una respuesta estocástica. En su documento histórico, Box y Wilson (1951) describen el desarrollo y la aplicación de este método secuencial para el diseño de procesos químicos, en el que se maximizan los rendimientos de compuestos particulares. Desde entonces, el método se ha aplicado con éxito en muchas áreas (Barton, 2013).

El enfoque de optimización estadístico generalmente requiere tres pasos, esto es, diseño, optimización y verificación. Una vez que los datos crudos de la tabla de diseño son obtenidos, pueden ser convertidos a modelos o gráficos tridimensionales para determinar los niveles óptimos de los factores investigados, finalmente, debe realizarse un experimento de verificación para validar los resultados optimizados (Wen y Chen, 2003).



2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, es necesaria la búsqueda de fuentes alternativas de energía, que además sean amigables con el medio ambiente. En este sentido, el cultivo de microalgas y cianobacterias se presenta como una estrategia para la producción de biocombustibles, específicamente biodiésel, ya que son materias primas renovables.

Por otro lado, en la producción de biodiésel algal, se presentan dos problemáticas. La primera es que el cultivo fotoautotrófico de estos microorganismos presenta baja concentración de biomasa; la segunda, el refinamiento de lípidos de esta biomasa incrementa el costo de producción.

Por estos motivos, el presente proyecto explora la posibilidad de incrementar el rendimiento de la biomasa a través del cultivo mixotrófico con acetato de sodio y glicerol, así como lograr la obtención de biodiésel de manera directa (sin necesidad de extraer los lípidos previamente) a través de un proceso conocido como transesterificación *in situ*.

3. HIPÓTESIS

Mediante un sistema de cultivo mixotrófico de microalgas combinado con la transesterificación *in situ* se incrementa la producción de biodiésel.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Desarrollar una metodología eficiente que permita el cultivo intensivo de microalgas con el propósito de obtener biomasa que garantice su empleo como fuente de materia prima para obtener biodiésel.

4.2. Objetivos particulares

- i. Seleccionar las especies adecuadas de microalgas a través de las cuales se obtendrá la biomasa para la producción de biodiésel.
- ii. Obtener los cultivos axénicos de las especies seleccionadas, que servirán como inóculo para las siguientes etapas del proyecto.
- iii. Desarrollar los protocolos eficientes para la producción de biomasa microalgal por medio de cultivo mixotrófico, utilizando como fuentes de carbono glicerol y acetato de sodio, incluyendo un control de cultivo en medio Bold.
- iv. Probar el cultivo mixotrófico con glicerol, con acetato de sodio y con una combinación de ambos.
- v. Estudiar el proceso de obtención de biodiésel a partir de la biomasa microalgal generada, probando la transesterificación *in situ* y *ex situ*. Todo lo anterior a nivel laboratorio.
- vi. Analizar los rendimientos de biodiésel obtenidos, basado en la cantidad de triglicéridos extraídos de la biomasa microalgal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos de estudio

5.1.1. *Chlorella vulgaris*

La cepa *C. vulgaris* (UTEX # 2714) se mantuvo en medio de cultivo basal Bold, BBM (Bischoff y Bold, 1963).

5.1.2. *Neochloris oleoabundans*

La cepa *N. oleoabundans* (UTEX # 1185) fue donada por la Dra. Diana Cárdenas del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). La cepa se mantuvo en medio de cultivo BBM (Bischoff y Bold, 1963).

5.1.3. *Nostoc muscorum*

La cepa *N. muscorum* (27893 ATCC) fue donada por la Dra. Diana Cárdenas (ITESM). La cepa se mantuvo en medio de cultivo BG-11 (Rippka *et al.*, 1979).

Todas las cepas se mantuvieron con un fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 h suministrado por lámparas fluorescentes de 17 W con un flujo luminoso de 1400 lm, a temperatura ambiente y agitación orbital continua a 120 rpm.

5.2. Sistemas de cultivo

5.2.1. Cultivos de mantenimiento y desarrollo del inóculo

Para el mantenimiento de las cepas algales se realizaron subcultivos periódicamente cada 15 a 22 días. El inóculo se obtuvo a partir de una alícuota de

los cultivos de mantenimiento y se incubó por 5 - 7 días hasta alcanzar una concentración de biomasa tal que los cultivos experimentales tuvieran como concentración inicial de 50 a 60 mg/L. Se utilizaron matraces Erlenmeyer con un volumen de trabajo del 50% de su capacidad total.

5.2.2. Cultivos experimentales

Los cultivos se desarrollaron en frascos de vidrio Kimax® de 1 L de capacidad, los cuales se adaptaron a manera de fotobiorreactores (FBRs) escala laboratorio con un volumen de trabajo de 800 ml.

Los FBRs se colocaron en un anaquel (85 x 30 x 180 cm); en cada entrepaño se dispusieron 4 focos fluorescentes de 13 W con un flujo luminoso de 950 lm ubicados de manera que a cada FBR le correspondiera un foco en posición lateral central. Los cultivos fueron mezclados continuamente mediante burbujeo con aire a través de difusores metálicos; el aire fue suministrado por una bomba (Maxima, Hagen Inc.) conectada a una válvula de control de aire de 4 salidas, y filtrado a través de membranas de 0.45 μm dispuestas en la conexión de entrada de cada FBR a razón de 0.625 vvm. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($\approx 24 - 34^\circ\text{C}$).

Para prevenir cualquier tipo de contaminación, el medio, los matraces y los FBRs fueron previamente esterilizados en autoclave por 15 min a 121°C antes de la inoculación. Asimismo, los cultivos y tomas de muestra se realizaron en campana de flujo laminar horizontal.

5.3. Procedimiento analítico

5.3.1. Toma de muestras y preparación de *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*

Los experimentos de las microalgas se llevaron a cabo por 15 días. Muestras de aproximadamente 10 ml se tomaron cada 3 días y se centrifugaron en microtubos previamente llevados a peso constante, en centrífuga Micro 17TR (Hanil Science Industrial Ltd.) a 13 000 rpm por 15 min a 6°C. Los sobrenadantes se recuperaron para el análisis de consumo de sustratos, mientras que las pastillas se lavaron con agua destilada, se centrifugaron nuevamente y se secaron a 60°C por 24 h.

5.3.2. Toma de muestras y preparación de *N. muscorum*

Los experimentos de la cianobacteria se llevaron a cabo por 10 días. Se tomaron muestras de 10 ml cada 2 días y se filtraron a través de filtros de microfibra de vidrio Whatman de grado GF/A previamente llevados a peso constante. Los filtrados se recuperaron para su posterior análisis de consumo de sustratos, mientras que los filtros conteniendo la biomasa se lavaron con agua destilada y se secaron a 60°C por 24 h.

5.3.3. Evaluación del crecimiento celular

El peso seco se determinó por sustracción del peso inicial al peso final de los microtubos o filtros, según la especie. La biomasa se almacenó para su posterior cuantificación de lípidos.

El crecimiento celular se evaluó en términos de concentración de biomasa y productividad volumétrica de biomasa como sigue:

$$CB = PS * 1000/V_m \quad (1)$$

Donde CB es la concentración de biomasa (mg/L), PS es el peso seco de biomasa (mg) y V_m es el volumen de muestra (ml). Y,

$$PB = (CB_t - CB_0)/(t - t_0) \quad (2)$$

Donde PB, es la productividad volumétrica (mg/L/d), CB_t es la concentración de biomasa en el tiempo t (d) y CB_0 es la concentración de biomasa en el tiempo inicial t_0 .

5.3.4. Evaluación del contenido de lípidos

La cantidad de lípidos (L) de la biomasa seca se determinó por el método propuesto por Byreddy *et al.* (2016) con algunas modificaciones. La curva de calibración se realizó para cada especie con su correspondiente aceite previamente extraído por método Soxhlet. Las ecuaciones lineales procedentes de cada curva se despejaron (ecuaciones 3, 4 y 5).

$$L_{Cv} = ((A_{530} + 0.0152) / 0.0043) * 100 / PS_m \quad (3)$$

$$L_{No} = ((A_{530} + 0.0023) / 0.0004) * 100 / PS_m \quad (4)$$

$$L_{Nm} = ((A_{530} + 0.023) / 0.0051) * 100 / PS_m \quad (5)$$

Donde L_{Cv} es la cantidad de lípidos (porcentaje) de *C. vulgaris*, L_{No} es la cantidad de lípidos de *N. oleoabundans*, L_{Nm} es la cantidad de lípidos de *N. muscorum*, A_{530} es la absorbancia a 530 nm y PS_m es el peso seco de la muestra utilizada en la cuantificación.

Las ecuaciones 3, 4 y 5 se relacionaron con la concentración de biomasa (de la ecuación 1) para calcular la concentración de lípidos como sigue:

$$CL = CB * L / 100 \quad (6)$$

Donde CL es la concentración de lípidos (mg/L), CB es la concentración de biomasa y L es la cantidad de lípidos (de las ecuaciones 3, 4 o 5).

5.3.5. Evaluación del consumo de sustratos

En los sobrenadantes o filtrados, según la especie, procedentes de la preparación de muestras, se determinaron nitrógeno de nitratos (N_NO₃), fósforo de ortofostato (P_PO₄), además de glicerol y acetato de sodio en los casos de muestras procedentes de cultivo mixotrófico.

N_NO₃ se determinó por el método de espectrofotometría UV (Greenberg, Clesceri, & Eaton, 1992) con adaptaciones. Alícuotas de 20 a 500 µl se aforaron a 3 ml con agua destilada, para ajustarse al límite de detección de la curva de calibración. La absorbancia se midió a 220 y a 275 nm; la relación A₂₇₅/A₂₂₀ menor a 0.05 se utilizó para probar la aplicabilidad del método. La ecuación procedente de la curva de calibración se despejó y relacionó con el factor de dilución para calcular N_NO₃ (ecuación 7).

$$N_{NO_3} = [(A_{220} - 2 * A_{275}) - 0.0078] / 0.2588 * FD \quad (7)$$

Donde N_NO₃ es la concentración de nitrógeno de nitratos (mg/L), A₂₂₀ es la absorbancia a 220 nm, A₂₇₅ es la absorbancia a 275 nm y FD es el factor de dilución de la muestra.

La concentración de fósforo se determinó por el método de azul de molibdeno descrito por Murphy y Riley (1962) con adaptaciones. Alícuotas de 20 a 300 µl se aforaron a 5 ml con agua destilada para ajustarse al límite de detección de la curva de calibración. Se midió la absorbancia a 880 nm (A₈₈₀). La ecuación lineal

procedente de la curva de calibración se despejó y se relacionó con el factor de dilución (FD) para calcular P_PO₄ (ecuación 8).

$$P_{PO_4} = ((A_{880} + 0.0056)/0.5459) * FD \quad (8)$$

La cuantificación de la concentración de glicerol (CG) se realizó por el método espectrofotométrico descrito por Kuhn *et al.* (2015) con pequeñas modificaciones. La curva de calibración se ajustó a un rango de concentraciones de glicerol de 0 a 10 g/L; alícuotas de 200 µl se hicieron reaccionar con 1 ml de reactivo I, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se agregó el reactivo II. Después de 5 min, la absorbancia a 410 nm (A₄₁₀) se midió. La ecuación lineal obtenida de la curva de calibración se despejó y se relacionó como sigue:

$$CG = (A_{410} + 0.0021)/0.0428 \quad (9)$$

La concentración de acetato de sodio (CA) en las muestras se determinó por microtitulación, adaptando el método de valoración de fármacos ANMAT (2013). Alícuotas de 1000 µl se desecaron y los residuos se disolvieron en 1000 µl de ácido acético glacial. Las soluciones resultantes se titularon con ácido perclórico 0.1 N, hasta el vire del indicador α-naftolbenceína de anaranjado a verde. Se realizaron blancos con medio BBM o BG-11 según correspondió, tratados al igual que las muestras para hacer las correcciones adecuadas. El cálculo final se realizó con la ecuación 10.

$$CA = (V_a - V_b) * (N/V_m) * PM \quad (10)$$

Donde CA es la concentración de acetato (g/L), V_a (µl) es el volumen de titulante para la muestra, V_b (µl) es el volumen de titulante para el blanco, N es la concentración normal del ácido perclórico, V_m (µl) es el volumen de la muestra y PM es el peso molecular del acetato de sodio.

Una vez que las concentraciones de los sustratos se obtuvieron, la eficiencia de consumo de sustratos (ECS) se calculó como:

$$ECS = (S_0 - S_t) * 100/S_0 \quad (11)$$

Donde S_t es la concentración de sustrato al tiempo t y S_0 es la concentración inicial de sustrato. S puede ser N_NO_3 , P_PO_4 , CG o CA de las ecuaciones anteriores (7 – 10).

5.4. Perfiles de crecimiento, producción de lípidos y consumo de nutrientes

Se realizaron los cultivos de *C. vulgaris* y *N. oleoabundans* en medio BBM, y para *N. muscorum* en medio BG-11 para conocer primeramente el comportamiento de los cultivos autotróficos.

5.5. Diseño experimental del cultivo mixotrófico

Para los cultivos mixotróficos de cada especie se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR).

Se estudiaron los efectos interactivos de tres factores, que son, concentración de acetato de sodio (X_1), concentración de glicerol (X_2), y, tiempo de cultivo (X_3), sobre las variables de respuesta: concentración de biomasa (Y_1), concentración de lípidos (Y_2), productividad de biomasa (Y_3), productividad de lípidos (Y_4) y porcentaje de lípidos (Y_5).

Para el desarrollo de ecuaciones de regresión que correlacionaran los factores con las variables, la superficie de respuesta de segundo orden se expresó como:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_1^2 + \beta_5X_2^2 + \beta_6X_3^2 + \beta_7X_1X_2 + \beta_8X_1X_3 + \beta_9X_2X_3 + \epsilon_r$$

Donde Y es la respuesta; β_0 es el intercepto; $\beta_1 - \beta_9$ son los coeficientes de regresión; X_1, X_2 y X_3 son los factores estudiados; y ϵ_r es el error residual.

Se utilizó el programa Minitab 18 para el análisis de regresión de la MSR y la optimización del cultivo mixotrófico, así como para obtener los gráficos de superficie de respuesta, de contornos y de optimización de respuestas.

Las pruebas estadísticas del modelo se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con prueba F. Para examinar la bondad del modelo, cada término del mismo fue probado estadísticamente y se confirmó la significancia de los valores F con $p \leq 0.05$. Los términos no significativos se sometieron al método de eliminación hacia atrás y se obtuvieron nuevas ecuaciones de regresión ajustadas, en los modelos que lo requirieron.

5.5.1. Cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*

El cultivo mixotrófico se realizó adicionando acetato de sodio y/o glicerol al medio Bold basal, de acuerdo al Diseño Central Compuesto (cuadro 5) de la MSR.

Cuadro 5. Niveles de los factores utilizados en el diseño central compuesto para *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*.

Factor	Factor codificado	Niveles				
		-2	-1	0	1	2
Acetato de Sodio (g /L)	X_1	0	2.5	5	7.5	10
Glicerol (g /L)	X_2	0	2.5	5	7.5	10
Tiempo (d)	X_3	3	6	9	12	15

5.5.2. Cultivo mixotrófico de *N. muscorum*

El cultivo mixotrófico se realizó adicionando acetato de sodio y/o glicerol al medio estándar BG-11, de acuerdo con el Diseño Box-Behnken (cuadro 6) de la MSR.

Cuadro 6. Niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken para *N. muscorum*

Factor	Factor codificado	Niveles		
		-1	0	1
Acetato de Sodio (g /L)	X_1	0	2.5	5
Glicerol (g /L)	X_2	0	2.5	5
Tiempo (d)	X_3	2	6	10

5.6. Verificación de las condiciones de optimización del cultivo mixotrófico

Con base en los análisis de regresión de los resultados obtenidos para el cultivo mixotrófico, se establecieron las proporciones adecuadas de acetato de sodio, glicerol y tiempo de cultivo para cada especie, buscando la maximización de las respuestas que resultaron significativas para el modelo experimental.

La biomasa obtenida del cultivo optimizado se recuperó, se secó a 60°C y se almacenó para realizar el análisis de composición de ácidos grasos.

Los experimentos del cultivo optimizado, así como los cultivos control se realizaron por triplicado.

5.7. Efecto de condiciones de estrés en los cultivos optimizados en la producción de lípidos y composición del biodiésel

Se evaluaron los efectos de estrés por salinidad y por deficiencia de nitrógeno en el cultivo mixotrófico optimizado.

Para esto, los cultivos se realizaron en dos fases; la fase I consistió en el crecimiento de biomasa de cada especie en las condiciones óptimas encontradas de acuerdo con la MSR. La concentración de nitrógeno se ajustó para que se agotara en el tiempo de cultivo óptimo.

Una vez transcurrido este tiempo se inició la fase II, en la que se buscó la inducción de la producción de lípidos y que consistió en: 1) reconstituir el medio, adicionando las soluciones de fósforo, glicerol y acetato necesarias para completarlo (Control Fase II); 2) imponer condiciones de estrés por nitrógeno limitante y nitrógeno deficiente, de acuerdo a los resultados obtenidos del consumo de sustratos y dependiendo del tratamiento por estrés a probar; y 3) imponer condiciones de estrés por salinidad baja y alta con cloruro de sodio.

En la fase II se evaluó el porcentaje de lípidos después de 5 días bajo cuatro tratamientos que se describen en el cuadro 7. La biomasa cosechada se secó a 60°C y se almacenó para su posterior análisis de composición de ácidos grasos.

Cuadro 7. Tratamientos para la inducción de la producción de lípidos por condiciones de estrés

Tratamiento	Condición	Concentración
Control	Cultivo mixotrófico	No aplica
T1	Nitrógeno deficiente	0
T2	Nitrógeno limitante	20 mg/L *, ó, 100 mg/L#
T3	Salinidad baja	0.5 g/L
T4	Salinidad alta	2.0 g/L

* Para *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*

Para *N. muscorum*

5.8. Análisis de la composición de ácidos grasos del biodiésel

Gracias al apoyo de la Dra. Diana Cárdenas (ITESM) fue posible hacer la identificación y cuantificación de los componentes del biodiésel, y con ello también fue posible estimar las propiedades del biodiésel obtenido.

La biomasa seca obtenida al término de cada fase fue sometida a transesterificación *in situ*, en condiciones ácidas, de acuerdo con el protocolo descrito por Richmond y Hu (2013) sin adición de estándar interno, para el análisis de composición de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). Los FAMES fueron disueltos en hexano para ser analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

El contenido de FAMES se determinó con un cromatógrafo de gases, modelo 7890B Agilent acoplado a un espectrómetro de masas, modelo 5977A MSD (detector selectivo de masas). Las muestras (1 μ L) se inyectaron en modo splitless. La separación se realizó en una columna capilar SP-2380 (30 m x 250 μ m x 0,2 μ m

de espesor de película). La presión de la cabeza de la columna del gas portador (helio) fue de 7,63 psi a la temperatura inicial del horno, y su caudal de 1 mL/min. La temperatura de inyección fue de 260°C; la temperatura del horno se programó de 50 °C a 240 °C a razón de 4 °C por minuto. Los datos se recolectaron con software de análisis de datos. El MSD funcionaba en modo de escaneo completo (m/z 30 a 550). La identificación y cuantificación de FAMEs se llevó a cabo mediante comparación de los tiempos de retención y cuantificación de iones con los correspondientes a la mezcla estándar de FAMEs (Supelco™ 37 component FAME mix, Sigma Aldrich Co.) en condiciones experimentales idénticas, comparando el tiempo de retención respectivo y los iones de cuantificación informados a cada FAME.

En la fase II, se realizó también la transesterificación *ex situ* de la biomasa cosechada a los 5 días de cultivo bajo condiciones de estrés.

5.9. Estimación de las propiedades combustibles del biodiésel

Los parámetros que comprueban la calidad del biodiésel pueden ser estimados en relación a las estructuras moleculares de los FAMEs de los cuales se componga, que varían según el tamaño de la cadena de carbono y la cantidad y/o posición de los dobles enlaces (Nascimento *et al.*, 2013).

Krisnangkura (1986) definió un modelo empírico para estimar el índice de cetano, basado en la composición de FAMEs de aceites vegetales; este modelo ha sido usado para estimar las propiedades del biodiésel obtenido a partir de aceite de microalgas y cianobacterias por otros autores, dando lugar a las ecuaciones empíricas que se describen a continuación (Anahas y Muralitharan, 2015; Francisco *et al.*, 2010; Rai y Gupta, 2017; Ramos *et al.*, 2009).

5.9.1. Índice de cetano

El índice de cetano (CN, *cetane number*) indica el retardo de tiempo en el encendido del combustible para motores diesel; aumenta con la longitud de la cadena de carbono no ramificada, de los componentes FAMES; a mayor CN, menor tiempo de encendido (Nascimento *et al.*, 2013).

5.9.2. Índice de saponificación

El índice de saponificación (SV, *saponification value*) es la cantidad de álcali necesaria para saponificar una cantidad definida de aceite o grasa; se expresa como el número de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) requerido para saponificar un gramo de grasa (Padrón *et al.*, 2001).

5.9.3. Índice de yodo

El índice de yodo (IV, *iodine value*) indica la tendencia del biodiésel a reaccionar con el oxígeno a temperatura ambiente; depende del número y posición de los dobles enlaces en la cadena de carbonos; a mayor IV, mayor posibilidad de oxidación, formación de depósitos y deterioro de la lubricidad del biodiésel (Nascimento *et al.*, 2013).

El CN, SV e IV se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 12 -14:

$$CN = 46.3 + \frac{5458}{SV} - (0.225 * IV) \quad (12)$$

$$SV = \sum_i \frac{560 * N_i}{M_i} \quad (13)$$

$$IV = \sum_i \frac{254 * D_i * N_i}{M_i} \quad (14)$$

Donde D es el número de dobles enlaces, M es el peso molecular y, N es el porcentaje en peso del *i*-ésimo FAME componente del biodiésel.

5.9.4. Grado de insaturación

Los ácidos grasos se representan con una C seguida de dos números: el primero es para el número total de átomos de carbono y el segundo es para el número total de dobles enlaces. La ausencia o presencia de dobles enlaces los agrupa como saturados (SFA) o insaturados (UFA); éstos últimos se clasifican como ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). El número de átomos de carbono presentes en los ácidos grasos y su tipo (SFA, MUFA y PUFA) son factores primarios que controlan las propiedades del biodiésel (Deshmukh *et al.*, 2019).

El grado de insaturación (DU, *degree of unsaturation*) se calculó con la ecuación empírica 15, tomando en cuenta la cantidad de MUFA y PUFA (% en peso) presentes en el biodiésel (Nascimento *et al.*, 2013).

$$DU = MUFA + (2 * PUFA) \quad (15)$$

Donde, MUFA es la suma de ácidos grasos monoinsaturados (% en peso), y PUFA es la suma de ácidos grasos poliinsaturados (% en peso).

5.9.5. Estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa (OS, *oxidative stability*) del biodiésel es un importante criterio para determinar su vida útil; el grado de insaturación, localización y número de los dobles enlaces de las cadenas de ácidos grasos, afectan la tasa de autooxidación. El biodiésel inestable a la oxidación disminuye el rendimiento del

motor debido a la alta viscosidad, la formación de gomas y la deposición de sedimentos (Patel *et al.*, 2017).

La estimación de la OS se calculó, basada en el contenido de C18:2 y C18:3 con la ecuación 16 (Arguelles *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2008).

$$OS = \frac{117.9295}{(C18:2 + C18:3)} + 2.5905 \quad (16)$$

Donde C18:2 es el porcentaje en peso del ácido linoléico, y C18:3 es el porcentaje en peso del ácido linolénico.

5.9.6. Viscosidad cinemática

La viscosidad cinemática (KV , *kinematic viscosity*) es una importante propiedad del biodiésel que se define por su capacidad de flujo, velocidad y calidad del aerosol inyectado en la cámara de combustión del motor; la KV de biodiésel suele ser un 10-15% más alta que los combustibles diesel convencionales debido a su gran peso molecular y estructura. Puede ser calculada con las siguientes fórmulas (Patel *et al.*, 2017):

$$\ln(KV_i) = -12.503 + (2.496 * \ln(M_i)) - (0.178 * D_i) \quad (19)$$

$$\ln(KV_B) = \sum_{i=1}^n x_i \ln(KV_i) \quad (20)$$

Donde KV_i es la viscosidad cinemática, D es el número de dobles enlaces, M es el peso molecular y x_i es la fracción molar del i -ésimo FAME componente del biodiésel, y, KV_B es la viscosidad cinemática del biodiésel.

5.9.7. Densidad

La densidad (ρ) juega un papel crucial para determinar la propiedad de inyección de combustible, y se relaciona con otros parámetros como el índice de cetano y el poder calorífico. Puede ser calculada con las siguientes ecuaciones (Patel *et al.*, 2017):

$$\rho_i = 0.8463 + (4.9/M_i) + (0.0118 * D_i) \quad (21)$$

$$\rho_B = \sum_{i=1}^n x_i \rho_i \quad (22)$$

Donde ρ_i es la densidad, D es el número de dobles enlaces, M es el peso molecular y x_i es la fracción molar del i -ésimo FAME componente del biodiésel, y, ρ_B es la densidad del biodiésel.

5.9.8. Poder calorífico superior

El poder calorífico superior (HHV, *high heating value*) es la energía de calentamiento desprendida en la combustión completa de una unidad de masa de combustible. Puede ser calculada con la siguiente ecuación (Patel *et al.*, 2017):

$$HHV = 49.43 - (0.041 * SV) - (0.015 * IV) \quad (23)$$

Donde SV es el índice de saponificación (de la ec. 13), e IV es el índice de yodo (de la ec. 14).

Las propiedades de flujo en frío del combustible diésel son evaluadas por las siguientes tres temperaturas: punto de nube, en el que comienza la cristalización; punto de obstrucción del filtro frío, en el que el combustible comienza a tapar un filtro de combustible; y, punto de fluidez en el que ya no fluye el combustible (Imahara *et al.*, 2006).

5.9.9. Punto de niebla

El punto de niebla o punto de nube (CP, *cloud point*) es la temperatura mínima a la cual las ceras presentes en el combustible comienzan a cristalizar por lo que tiene un aspecto turbio (Singh *et al.*, 2019). Puede ser calculada mediante la siguiente ecuación (Sarin *et al.*, 2009):

$$CP = (-0.576 * UFA) + 48.255 \quad (0 < UFA \leq 84) \quad (24)$$

Donde, UFA es el contenido total de FAMES insaturados, *i.e.* MUFA+PUFA (% en peso)

5.9.10. Punto de obstrucción de filtros en frío

El punto de obstrucción de filtros en frío (CFPP, *cold filter plugging point*) es utilizado para la predicción del rendimiento de flujo del biodiésel a bajas temperaturas; a mayor longitud de las cadenas de carbono o mayor grado de saturación de las moléculas de los FAMES, mayor será el valor de CFPP, y peor serán sus propiedades a bajas temperaturas (Nascimento *et al.*, 2013).

La ecuación 25 se generó al correlacionar el valor del CFPP con un factor relacionado con la saturación y longitud de las cadenas de carbono (LCSF, *long-chain saturated factor*). El LCSF se estimó de acuerdo con la ecuación 26, ponderando los valores de las cadenas largas (Patel *et al.*, 2017).

$$CFPP = (3.1417 * LCSF) - 16.477 \quad (25)$$

$$LCSF = (0.1 * C: 16) + (0.5 * C: 18) + (1 * C: 20) + (1.5 * C: 22) \\ + (2 * C: 24) \quad (26)$$

Donde C:16, C:18, C:20, C:22 y C:24 son los porcentajes en peso del ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico y ácido lignocérico, respectivamente.

5.9.11. Punto de fluidez

El punto de fluidez (PP, *pour point*) es la temperatura por debajo de la cual el combustible deja de fluir; puede ser obtenida mediante la siguiente ecuación (Sarin *et al.*, 2009):

$$PP = (-0.626 * UFA) + 45.594 \quad (0 < UFA \leq 84) \quad (27)$$

Donde, UFA es el contenido total de FAMES insaturados, *i.e.* MUFA+PUFA (% en peso)

5.9.12. Punto de inflamabilidad

El punto de inflamabilidad o punto de destello (FP, *flash point*) es la temperatura más baja a la que los vapores de combustible se incendian cuando entran en contacto con alguna fuente de fuego (Singh *et al.*, 2019). El punto de inflamación en el biodiésel es un indicador del metanol residual de la reacción de transesterificación, así como de las capacidades de manejo, almacenamiento y seguridad (Tutunea *et al.*, 2019). Se puede calcular de acuerdo con la siguiente ecuación (Su *et al.*, 2011):

$$FP = (23.362 * N_C) + (4.854 * N_{DB}) \quad (28)$$

Donde N_C es el promedio ponderado del número de átomos de carbono; y, N_{DB} : promedio ponderado del número de dobles enlaces de los FAMES componentes del biodiésel.

6. RESULTADOS

6.1. Selección de las especies de estudio

Se seleccionaron tres especies de estudio, dos correspondientes a las algas verdes y una correspondiente a las cianobacterias.

Přibyl *et al.* (2014) mencionan que de acuerdo al conocimiento taxonómico actual, las algas cuentan con más de 30 000 especies, de las que la mayoría son microalgas, sin embargo muy pocas de ellas se usan tradicionalmente en investigación o para aplicaciones biotecnológicas; dentro de éstas, algunas especies son conocidas por producir altos niveles de lípidos pero lo que es notable es que estas “hiperacumuladoras de lípidos” (también llamadas “oleaginosas” por otros autores) son mayormente miembros de las algas verdes y comprenden 4 clases: Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Bacillariophyceae y Eustigmatophyceae.

La primera especie que se tomó en cuenta para el proyecto fue *Chlorella vulgaris*. Esta especie pertenece a la clase Trebouxiophyceae (Champenois *et al.*, 2015). Las microalgas verdes cocoides pertenecientes al género *Chlorella*, son microalgas comercialmente importantes, con una producción mundial de hasta 2000 t en 2005, principalmente para el mercado de la nutrición humana (Champenois *et al.*, 2015). Además, el género *Chlorella* se considera modelo de estudios en acumulación de lípidos y su proporción de ácidos grasos de cadena corta (de 16 a 18 carbonos) que son adecuados para la transesterificación en el proceso de producción de biodiésel (Wang *et al.*, 2014).

La segunda especie elegida para el proyecto, *Neochloris oleoabundans*, pertenece a la clase Chlorophyceae; es considerada también una especie oleaginoso dado que presenta contenidos de lípidos de 23 a 65% de su biomasa en

peso seco (Formighieri, 2015; Mata *et al.*, 2010). Bajo condiciones adversas tales como deficiencia de nitrógeno, la fracción más grande de lípidos consisten en TAGs, ricos en ácidos grasos saturados, lo cual la hace una especie buena como candidata a la producción de biodiésel (Formighieri, 2015; Santos *et al.*, 2013).

Finalmente, se eligió a la cianobacteria *Nostoc muscorum* para explorar la posibilidad de ser usada como materia prima para producir biodiésel debido a que hasta donde se había revisado en la literatura, los reportes encontrados sobre su producción de lípidos eran escasos y contradictorios, Rusydi *et al.* (2015) encontraron un porcentaje de 2.43% de lípidos, mientras que Mostafa y Mahmoud (2012) habían encontrado porcentajes de hasta 16.8%, pero en ambos casos, no se reportó la composición de ácidos grasos. Esto, aunado con la característica de rápido crecimiento en biomasa, fueron razones para la elección de esta especie de estudio.

6.2. Cultivos axénicos de las especies de estudio

Si bien las especies de estudio no son cepas nativas, sino de colecciones, es decir, que se tenían cultivos monoalgales, durante los experimentos hubo riesgos de contaminación principalmente por dos causas: 1) los FBRs fueron frascos con adaptaciones, por lo que las juntas pudieron ser causa de contaminación, 2) el cultivo mixotrófico implica la adición de fuentes de carbono orgánicas (en este caso, glicerol y acetato de sodio) lo que conlleva el riesgo de contaminación y competición con otros microorganismos que crecen más rápido que las microalgas (Perez-García y Bashan, 2015).

Por lo anterior, fue necesario realizar un protocolo de purificación y verificación de los cultivos axénicos.

Primeramente, se tomaron muestras de los cultivos líquidos y se inocularon en cajas petri con agar nutritivo, por una semana en oscuridad; posteriormente, se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tomaron muestras de la contaminación y se realizó una tinción simple para observarlas al microscopio, con lo que se confirmó que la contaminación era por bacterias. Se procedió a purificar el cultivo para recuperar la microalga.

Para la purificación se realizó un lavado por centrifugación (Richmond y Hu, 2013; Voltolina-Lobina y Arredondo-Vega, 2007); se tomaron cuatro muestras de 2 mL de un cultivo de *N. oleoabundans* en fase exponencial, se centrifugaron a 2000 rpm (Micro 17TR, Hanil Science Industrial Ltd.) por 60 segundos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en medio BBM estéril. La centrifugación se realizó por este corto período de tiempo para permitir que sólo una porción de células microalgales (más pesadas) sedimentara mientras que en el sobrenadante se tiene a las bacterias contaminantes (menos pesadas). Este procedimiento se repitió cinco veces en las mismas muestras, para asegurar que en el sedimento quedaran únicamente células microalgales. En el último lavado se resuspendió en 1 mL de medio estéril.

Posteriormente se prepararon cajas de petri con: 1) Medio BBM, 2) Medio BBM adicionado con antibióticos, y 3) Agar nutritivo. Los antibióticos y dosis utilizados fueron 100 µg/mL de tetraciclina combinados con 10 µg/mL de ampicilina de acuerdo a lo sugerido por Kobayashi *et al.* (2015). Se transfirieron 20 µL de las muestras lavadas por centrifugación a cada caja petri y se distribuyeron con asa de platino. Se incubaron las cajas, y se seleccionaron las colonias que crecieron libres de bacterias (donde no hubo crecimiento en las cajas con agar nutritivo) para transferirlas a medio BBM líquido.

Como protocolo de seguridad, cada vez que se inició experimentos, se verificó que los inóculos estuvieran libres de bacterias, inoculando una muestra en agar nutritivo e incubándolas en oscuridad por una semana; sólo aquellas muestras en las que no hubo crecimiento bacteriano fueron tomadas como cultivos algales axénicos.

6.3. Desarrollo del sistema de cultivo

En la búsqueda del sistema de cultivo donde se llevaría a cabo la parte experimental del proyecto, se buscaron materiales económicamente accesibles y que al mismo tiempo pudieran ser adaptados como biorreactores para el cultivo de microorganismos fotosintéticos.

Como primera opción, se eligieron frascos de vidrio VI-LAB® de 1600 ml de capacidad, con tapón de hule con orificios, a los que se colocaron difusores de roca volcánica para lograr una buena agitación y aireación, sin embargo, tuvieron que cambiarse por difusores metálicos ya que, tras varias pruebas, presentaban ruptura al momento de esterilizarse en autoclave por lo que este primer sistema tuvo que ser descartado. Como segunda opción, se eligieron frascos KIMAX® de 1 L, ya que son esterilizables; los difusores metálicos resultaron adecuados por su capacidad de ser autoclaveados. De esta manera fue posible conformar los sistemas de cultivo experimentales (figura 6).

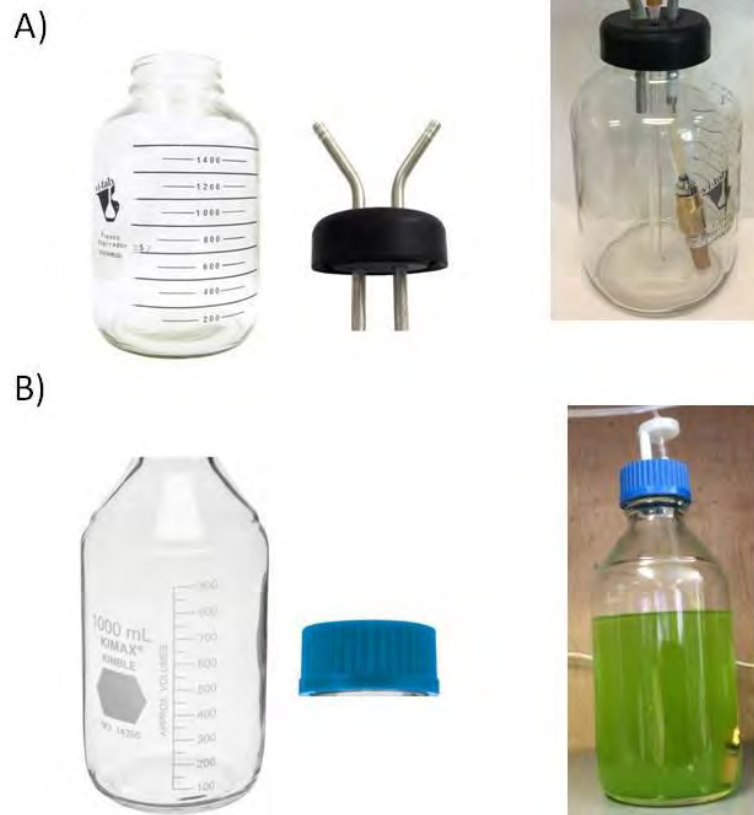


Figura 6. Desarrollo del sistema de cultivo de microorganismos fotosintéticos. A) Primer diseño a partir de frascos VI-LAB® de 1600 ml de capacidad; a la derecha el frasco adaptado como fotobiorreactor con difusor metálico; B) Diseño final a partir de frascos KIMAX® de 1 L; a la derecha el frasco adaptado con difusor metálico y cultivo microalgal.

De manera simultánea al desarrollo de los sistemas de cultivo, se realizó el desarrollo de los estantes para el crecimiento de los cultivos (figura 7), para lo cual se acondicionaron tres anaqueles tipo esqueleto con lámparas (ver sección de materiales y métodos para una descripción detallada), bombas de aire, mangueras y válvulas, así como conexiones eléctricas. Los estantes fueron cubiertos con telas negras y las lámparas de baja intensidad fueron programadas en un fotoperiodo de 8 h de luz por 16 h de oscuridad debido a que las altas intensidades en la iluminación pueden causar estrés y riesgo de foto-inhibición, reduciendo finalmente la concentración de biomasa (Bermejo *et al.*, 2021; Thepsuthammarat *et al.*, 2024). Los estantes se colocaron en el área de laboratorio, y no se cuenta con ningún

sistema de regulación de temperatura, por lo que fue necesario colocar un termómetro de Six para monitorear los rangos de temperaturas durante los experimentos.

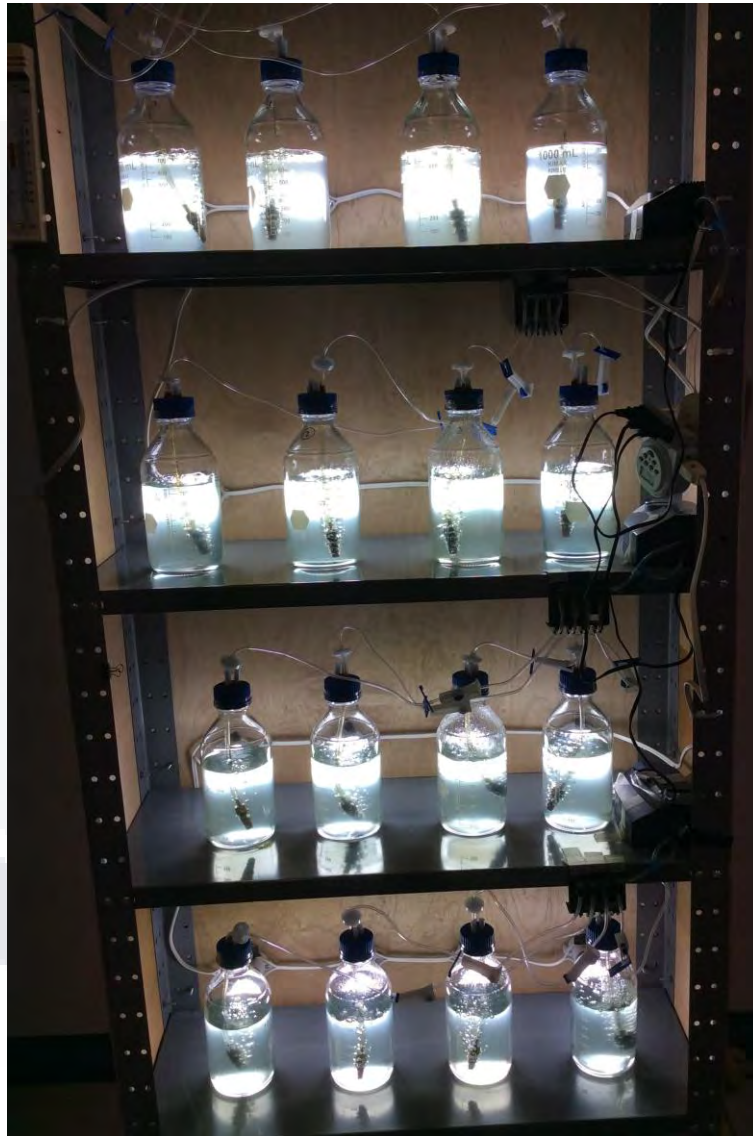


Figura 7. Conformación del sistema de cultivo en estantes adaptados para el crecimiento de microorganismos de estudio.

6.4. Perfiles iniciales de crecimiento, consumo de nutrientes y porcentaje de lípidos

Se cultivaron las especies de estudio en los FBRs, con sus respectivos medios de cultivo, para conocer el comportamiento del crecimiento, consumo de nitrógeno y fósforo, así como la producción de lípidos, inicialmente en cultivo autotrófico.

Para *C. vulgaris* la concentración de biomasa alcanzó 342 mg/L a los 15 días de cultivo, sin embargo, el mayor contenido de lípidos se logró el día 12, con una concentración de 46 mg/L (figura 8). En el caso de *N. oleoabundans* la concentración de biomasa fue de 556 mg/L a los 15 días de cultivo, e igualmente que para *C. vulgaris*, el mayor contenido de lípidos se alcanzó el día 12, con una concentración de 326 mg/L (figura 9). *N. muscorum* tuvo una concentración de biomasa de 217 mg/L, con una concentración de 12 mg/L y 9 % de lípidos en el día 8 (figura 10).

Para el caso del consumo de N_{NO_3} en todos los casos se observó que la cantidad total que se tenía en cada medio de cultivo no se alcanzó a agotar, mientras que para el consumo de P_{PO_4} se tuvo un comportamiento similar en las microalgas, pero en el caso de la cianobacteria estuvo muy cerca de agotarse completamente para el final del experimento.

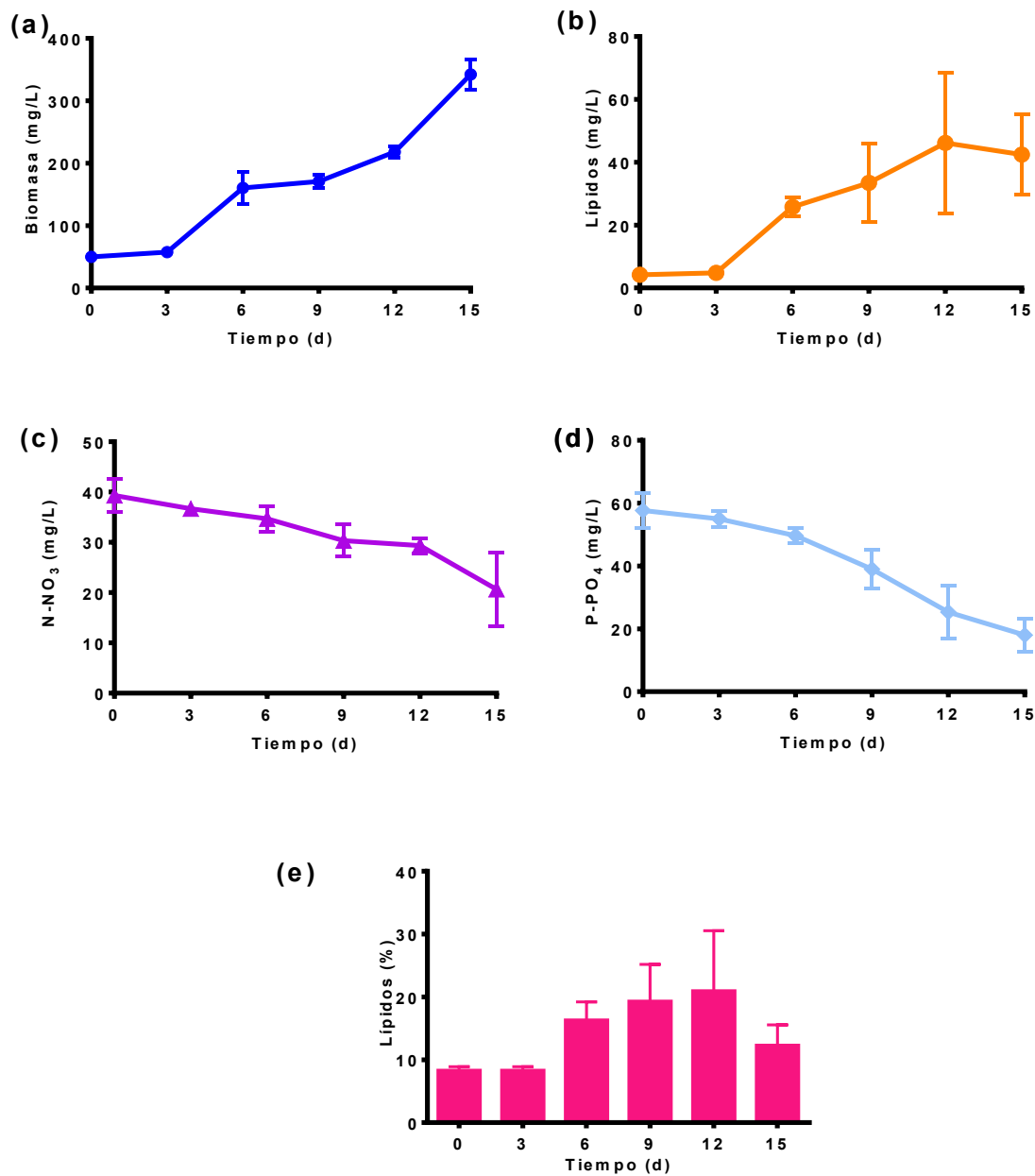


Figura 8. Perfiles de crecimiento, acumulación de lípidos y asimilación de nutrientes en medio Bold de *C. vulgaris*. (a) Curva de crecimiento; (b) Concentración de lípidos; (c) Consumo de N-NO₃; (d) Consumo de P-PO₄; y, (e) Porcentaje de lípidos. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

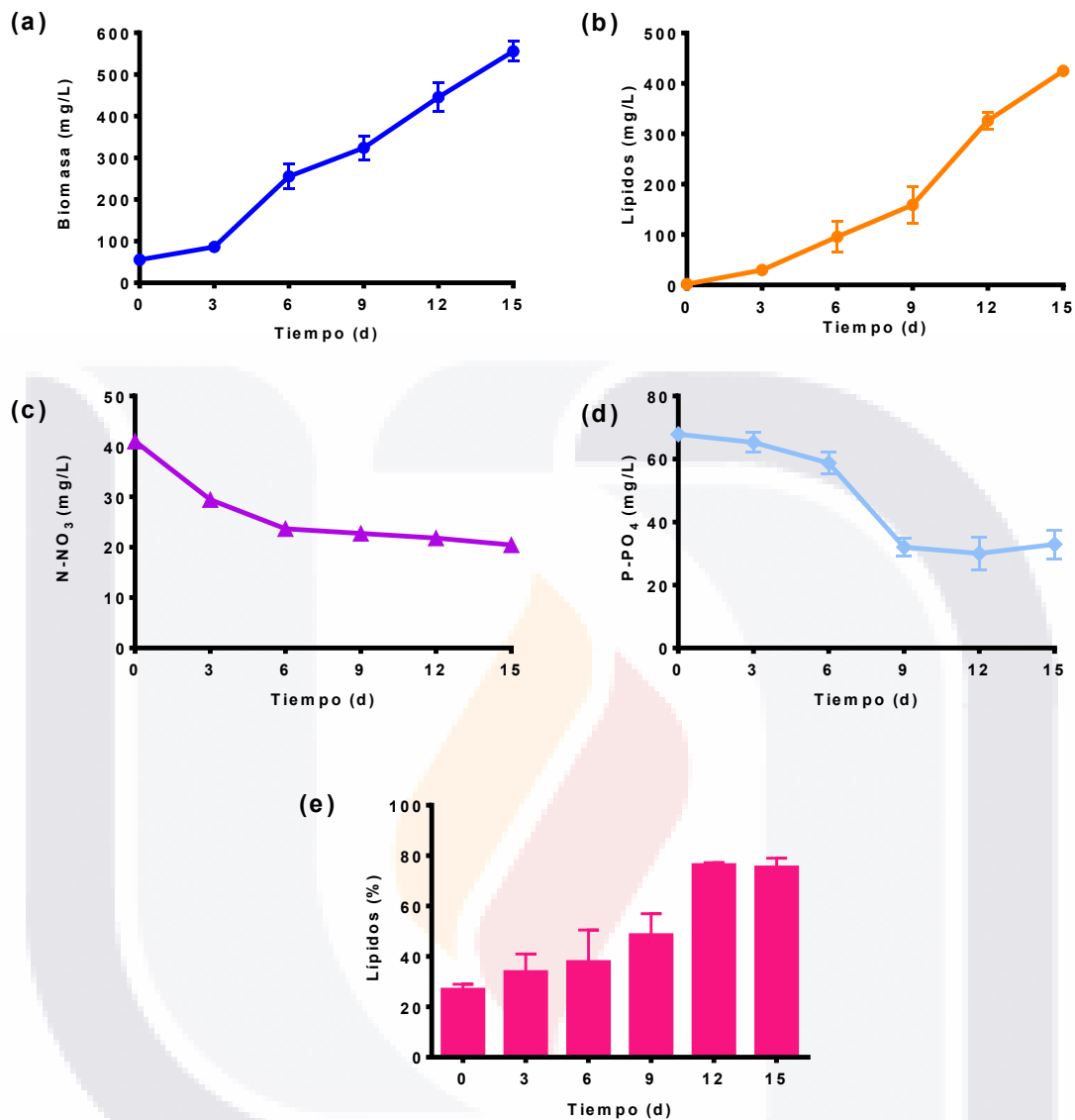


Figura 9. Perfiles de crecimiento, acumulación de lípidos y asimilación de nutrientes en medio Bold de *N. oleoabundans*. (a) Curva de crecimiento; (b) Concentración de lípidos; (c) Consumo de N-NO₃; (d) Consumo de P-PO₄; y, (e) Porcentaje de lípidos. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

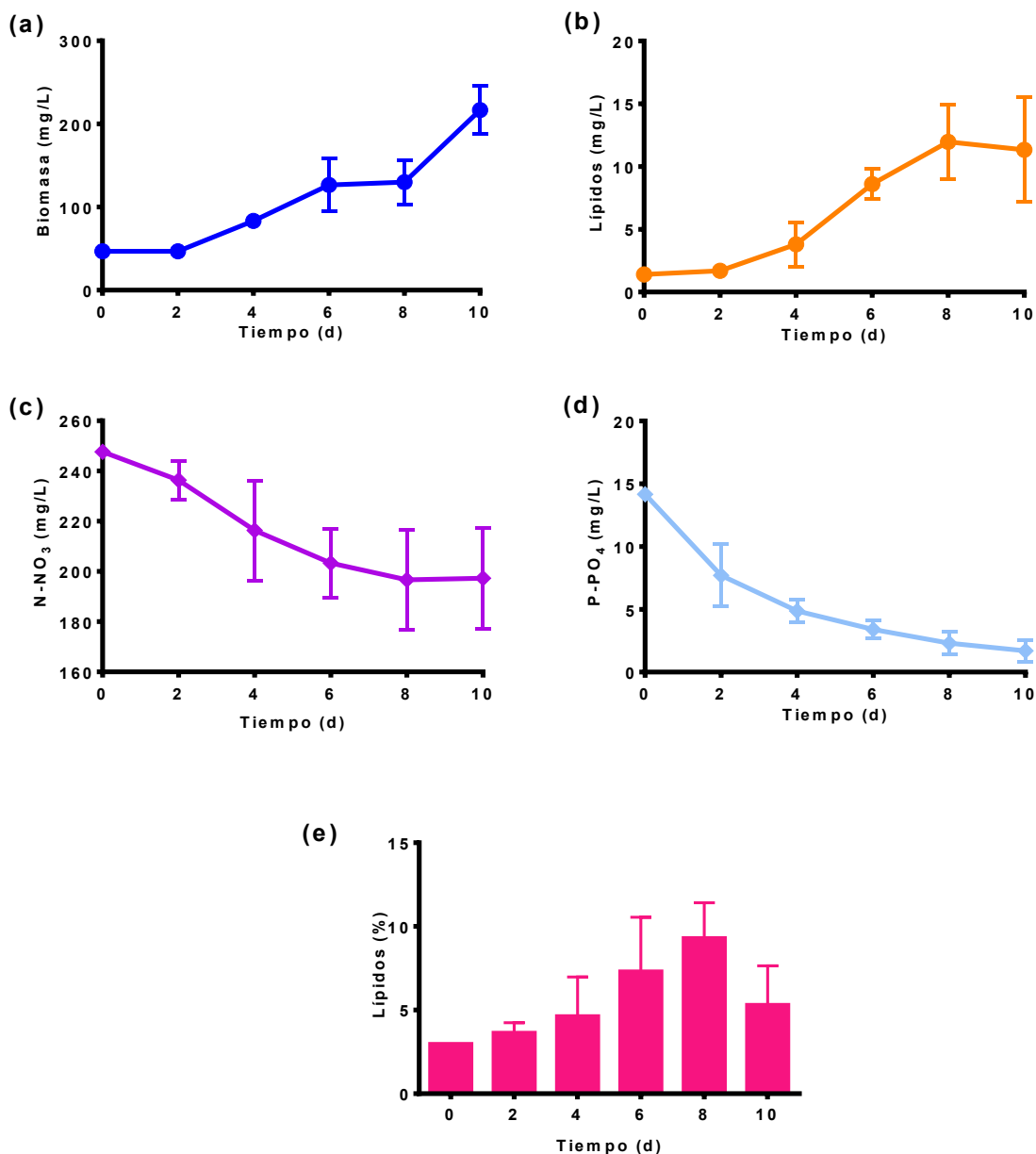


Figura 10. Perfiles de crecimiento, acumulación de lípidos y asimilación de nutrientes en medio Bold de *N muscorum*. (a) Curva de crecimiento; (b) Concentración de lípidos; (c) Consumo de N-NO₃; (d) Consumo de P-PO₄; y, (e) Porcentaje de lípidos. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Con estos primeros resultados de los cultivos autotróficos, fue posible establecer los tiempos de cultivo para los inóculos de la siguiente parte del proyecto: el cultivo mixotrófico.

6.5. Efecto del cultivo mixotrófico sobre la biomasa y los lípidos de *C. vulgaris*

Se realizaron 20 corridas experimentales de acuerdo con el diseño central compuesto de la MSR; la matriz del diseño y los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 8. Matriz del diseño central compuesto de la MSR con las respuestas observadas en el cultivo mixotrófico de *C. vulgaris*

Corrida	Factores			Respuestas observadas				
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
	Acetato (g/L)	Glicerol (g/L)	Tiempo (d)	CB (mg/L)	CL (mg/L)	PB (mg/L/d)	PL (mg/L/d)	L (%)
1	7.5	2.5	6	981	309	164	51	31
2	5	5	15	1093	134	73	9	12
3	7.5	7.5	6	407	66	68	11	16
4	2.5	2.5	12	593	116	49	10	20
5	5	5	9	981	239	109	27	24
6	5	0	9	1037	309	115	34	30
7	5	5	9	907	164	101	18	18
8	5	10	9	1500	360	167	40	24
9	7.5	2.5	12	1241	346	103	29	28
10	5	5	9	1148	238	128	26	21
11	2.5	7.5	12	944	230	79	19	24
12	5	5	3	204	85	68	28	42
13	0	5	9	222	15	25	2	7
14	5	5	9	1296	320	144	36	25
15	2.5	7.5	6	1000	220	167	37	22
16	5	5	9	1352	191	150	21	14

17	10	5	9	1056	252	117	28	24
18	7.5	7.5	12	704	242	59	20	34
19	5	5	9	1093	190	121	21	17
20	2.5	2.5	6	759	212	127	35	28

CB: Concentración de biomasa; CL: Concentración de lípidos; PB: Productividad de biomasa; PL: Productividad de lípidos; L: Porcentaje de lípidos

6.5.1. Análisis de la regresión de superficie de respuesta para *C. vulgaris*

Una vez que se obtuvieron los resultados anteriormente mostrados, se procedió a realizar la regresión de superficie de respuesta que se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta para *C. vulgaris*

Fuente	Respuestas									
	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4		Y_5	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Modelo	3.17	0.043	5.42	0.007	2.21	0.116	4.25	0.017	1.94	0.159
Lineal	2.55	0.115	3.62	0.053	1.47	0.280	5.06	0.022	2.59	0.111
X_1	2.95	0.117	9.46	0.012	1.44	0.259	4.38	0.063	3.56	0.089
X_2	0.17	0.690	0.33	0.581	0.06	0.813	0.79	0.395	0.63	0.445
X_3	4.53	0.059	1.07	0.325	2.92	0.118	10.01	0.010	3.59	0.087
Cuadrático	4.56	0.029	7.30	0.007	3.04	0.079	3.31	0.066	1.81	0.209
X_1^2	7.03	0.024	3.86	0.078	4.34	0.064	2.25	0.164	0.43	0.528

X_2^2	0.28	0.606	7.45	0.021	0.35	0.570	4.80	0.053	2.30	0.161
X_3^2	6.78	0.026	6.35	0.030	4.43	0.061	0.74	0.410	2.42	0.151
Interacción	2.39	0.130	5.33	0.019	2.12	0.162	4.39	0.032	1.41	0.298
$X_1 X_2$	5.90	0.036	9.50	0.012	5.10	0.047	7.79	0.019	0.15	0.703
$X_1 X_3$	1.23	0.293	3.90	0.077	1.06	0.327	1.92	0.195	1.17	0.304
$X_2 X_3$	0.04	0.837	2.59	0.138	0.19	0.675	3.47	0.092	2.89	0.120
Falta de ajuste	3.09	0.120	0.88	0.556	4.82	0.055	2.03	0.227	4.29	0.068
R^2	74.02 %		82.98 %		66.55 %		79.29 %		63.54 %	
R^2 ajustada	50.64 %		67.66 %		36.45 %		60.65 %		30.72 %	

Y1: Concentración de biomasa; Y2: Concentración de lípidos; Y3: Productividad de biomasa; Y4: Productividad de lípidos; Y5: Porcentaje de lípidos

Las ecuaciones de regresión para las respuestas con significancia estadística ($p \leq 0.05$) obtenidas son:

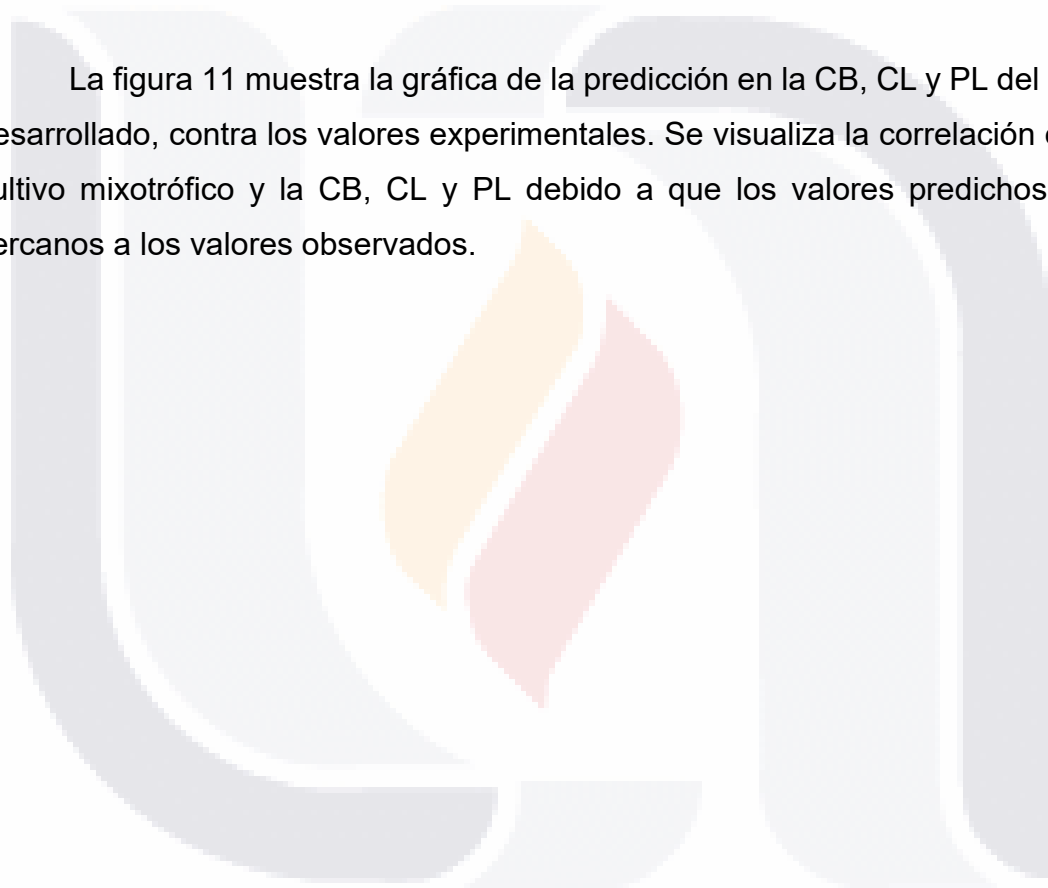
$$Y_1 = -1283 + 306X_1 + 116X_2 + 224X_3 - 20.98X_1^2 + 4.21X_2^2 - 14.31X_3^2 - 34.1X_1X_2 + 13X_1X_3 + 2.5X_2X_3$$

$$Y_2 = 82 + 52X_1 - 39.7X_2 + 13.2X_3 - 3.37X_1^2 + 4.68X_2^2 - 3X_3^2 - 9.36X_1X_2 + 5X_1X_3 + 4.08X_2X_3$$

$$Y_4 = 53.6 + 6.74X_1 - 5.98X_2 - 5.21X_3 - 0.363X_1^2 + 0.530X_2^2 - 0.145X_3^2 - 1.197X_1X_2 + 0.496X_1X_3 + 0.666X_2X_3$$

Los signos positivos en el modelo significan efectos sinérgicos de los factores, mientras que los negativos indican efectos antagonistas. Los términos cuadráticos indican la curvatura de las gráficas, donde es posible maximizar la respuesta; estas ecuaciones de regresión muestran que la concentración de biomasa, y la concentración y productividad de lípidos de *C. vulgaris* está afectada positivamente por la concentración de glicerol.

La figura 11 muestra la gráfica de la predicción en la CB, CL y PL del modelo desarrollado, contra los valores experimentales. Se visualiza la correlación entre el cultivo mixotrófico y la CB, CL y PL debido a que los valores predichos fueron cercanos a los valores observados.



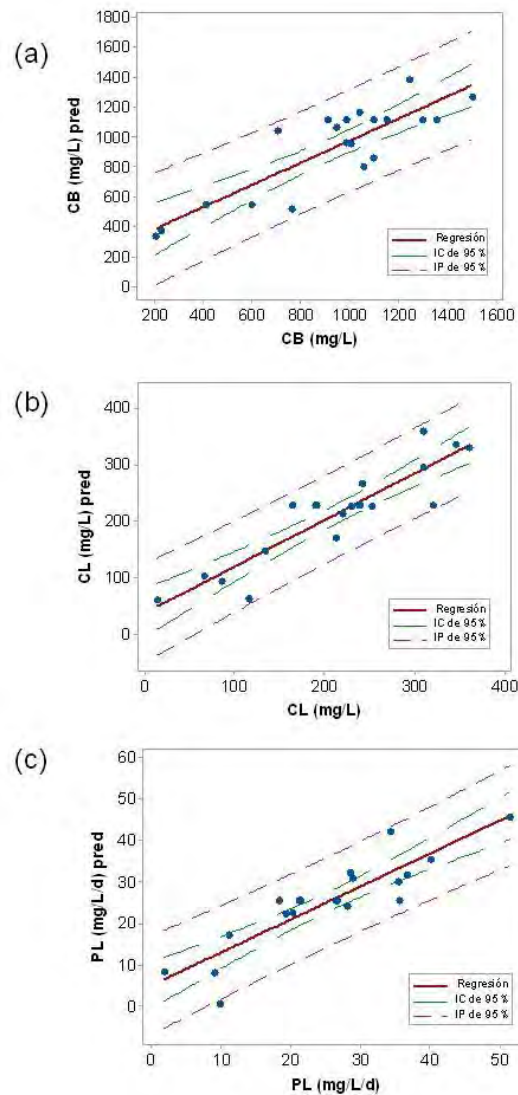


Figura 11. Gráficas de línea ajustada para la regresión de la superficie de respuesta de *C. vulgaris*.

6.5.2. Análisis de las superficies de respuesta para *C. vulgaris*

Las superficies de respuesta se graficaron para investigar la interacción entre las variables y así determinar la condición óptima de cada factor para lograr una respuesta máxima. El efecto de la concentración de glicerol, acetato y el tiempo de cultivo sobre la concentración de biomasa y la cantidad y productividad de lípidos se presentan en las figuras 12 a 14.

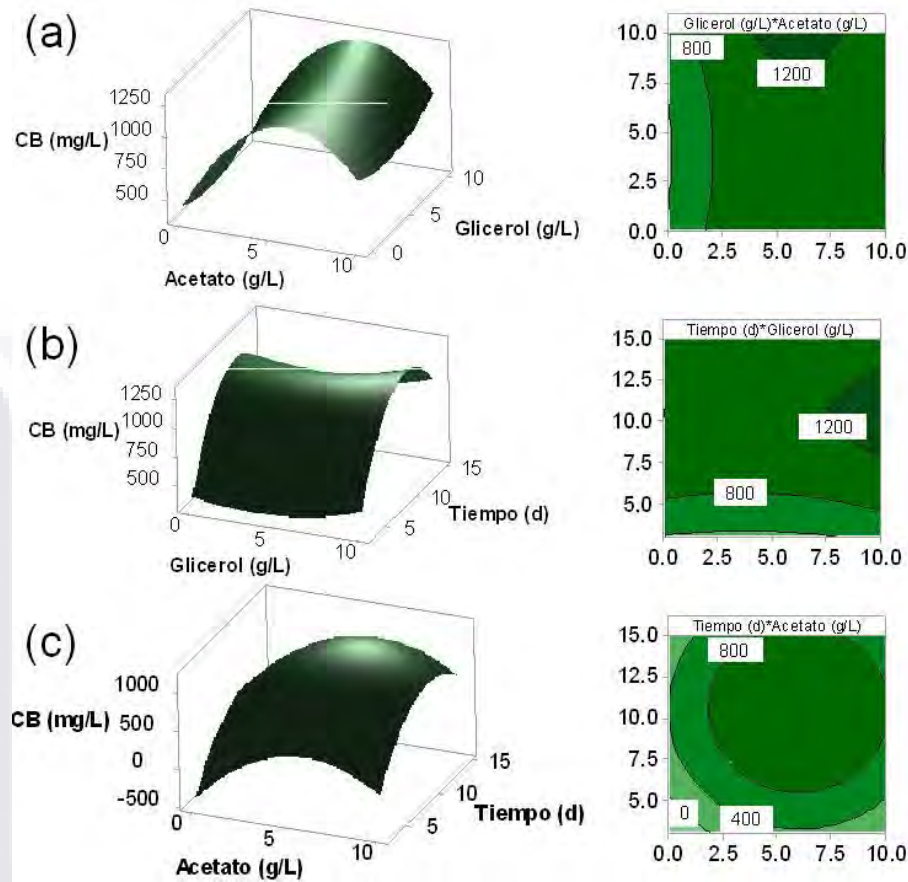


Figura 12. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de biomasa (CB) de *C. vulgaris* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

En la figura 12, la presencia de curvatura en las superficies nos permite saber que las respuestas pueden ser maximizadas. Además, las gráficas de contorno muestran que la concentración de biomasa aumenta cuando la concentración de glicerol aumenta mientras la concentración de acetato y el tiempo se mantienen en los niveles centrales del modelo experimental.

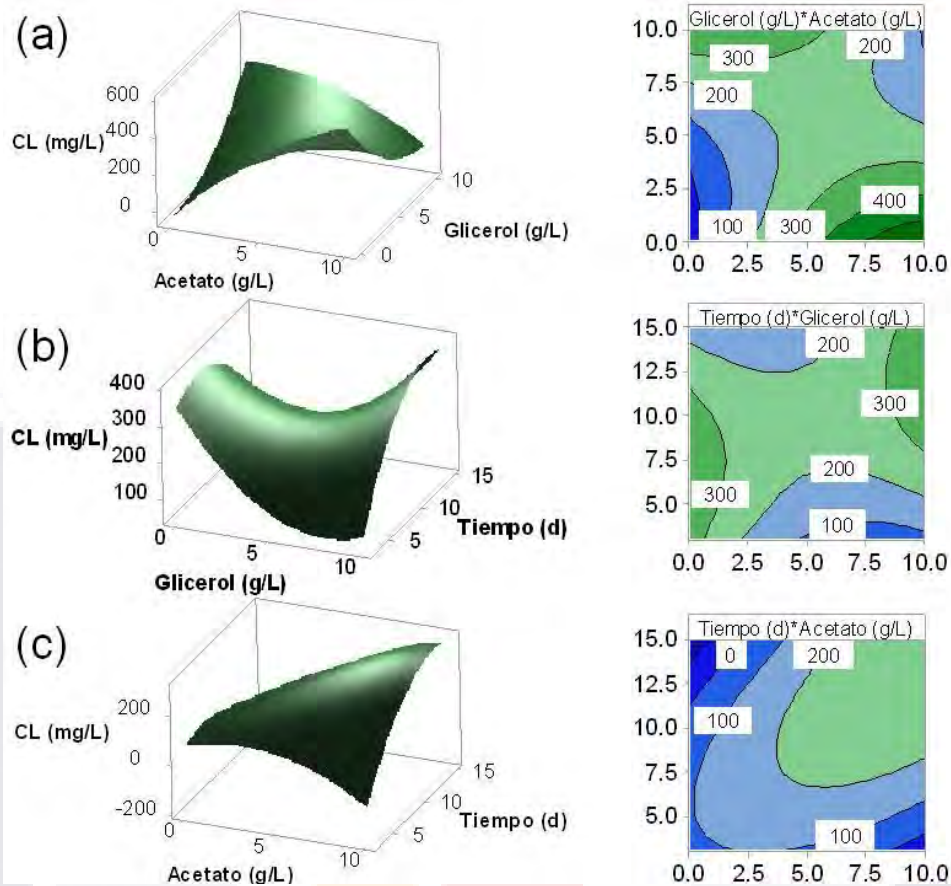


Figura 13. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de lípidos (CL) de *C. vulgaris* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

En el caso de la CL, no se observa con claridad una superficie de respuesta con una tendencia de maximización, a excepción del inciso (a) donde se alcanza a apreciar que al aumentar la concentración de acetato y disminuir la de glicerol, se puede alcanzar alrededor de 400 mg/L.

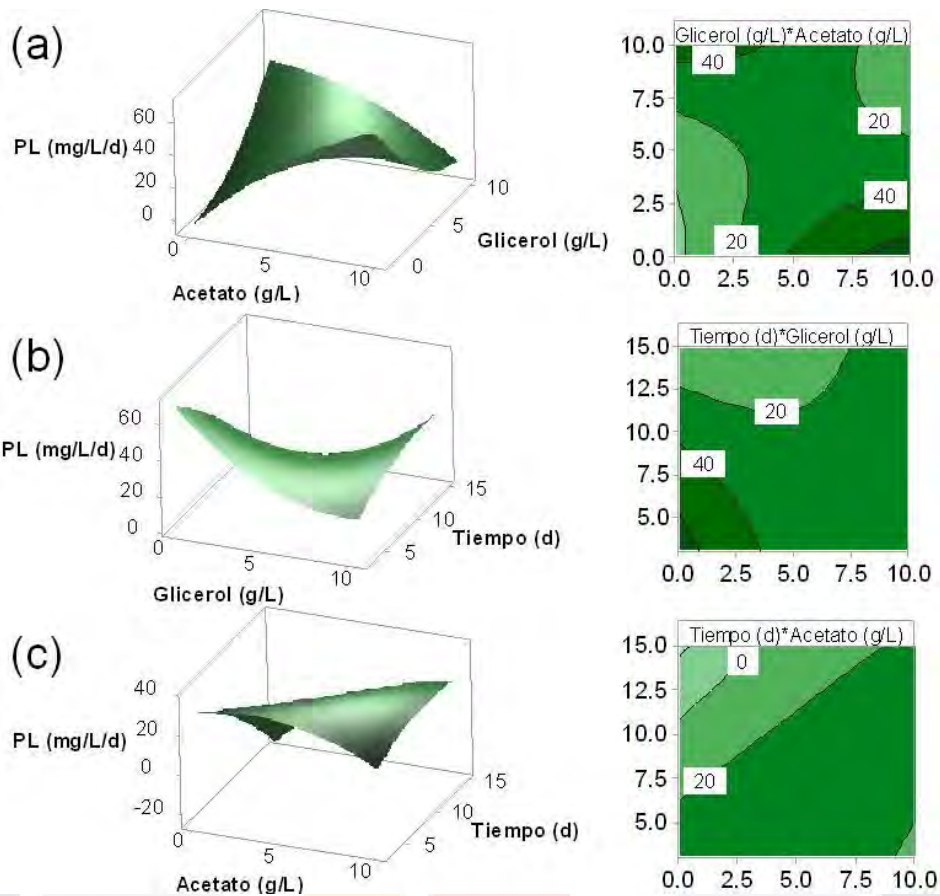


Figura 14. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la productividad de lípidos (PL) de *C. vulgaris* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

La figura 14(a) muestra que la PL aumenta cuando la concentración de glicerol es baja y la de acetato es alta. La relación entre la concentración de acetato y el tiempo se observa en la figura 14(c), a medida que aumentan ambos factores, la PL es mayor también.

6.5.3. Desarrollo de las condiciones óptimas del cultivo mixotrófico para *C. vulgaris*

Para obtener las máximas respuestas, se llevó a cabo la optimización utilizando el software Minitab.

La corrida de confirmación se estableció en 10 g/L de acetato, 0.743 g / L de glicerol y 12 días de tiempo de cultivo, de acuerdo con el diagrama de optimización, que predijo valores máximos de 1726 ± 469 mg/ L de CB, 532 ± 101 mg/L de CL y 53.80 ± 14.30 mg/L/d de PL. Los datos experimentales para la corrida de confirmación se obtuvieron junto con un cultivo de control (cuadro 10).

Cuadro 10. Validación del modelo de MSR de *C.vulgaris*.

Respuestas	Control*	Condiciones óptimas**
Concentración de biomasa (mg/L)	300.93 ± 44.65	1862.50 ± 81.97
Productividad de lípidos (mg/L/d)	5.64 ± 0.77	45.18 ± 3.28
Concentración de lípidos (mg/L)	73.08 ± 9.27	548.20 ± 40.04

*Medio BBM y 12 días de tiempo de cultivo

**Medio BBM adicionado con 10 g/L de acetato, 0.743 g/L de glicerol y 12 días de tiempo de cultivo

Todos los valores representan la media ± desviación estándar con n = 3

En el caso de CB y CL los resultados obtenidos superaron los valores de predicción del modelo, y además todas las respuestas superaron los resultados obtenidos en el cultivo control 6, 7 y 8 veces respectivamente.

6.6. Efecto del cultivo mixotrófico sobre la biomasa y los lípidos de *N. oleoabundans*

Se realizaron 20 corridas experimentales de acuerdo con el diseño central compuesto de la MSR; la matriz del diseño y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Cuadro 11. Matriz del diseño central compuesto de la MSR con las respuestas observadas en el cultivo mixotrófico de *N. oleoabundans*.

Corrida	Factores			Respuestas observadas				
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
	Acetato (g/L)	Glicerol (g/L)	Tiempo (d)	CB (mg/L)	CL (mg/L)	PB (mg/L/d)	PL (mg/L/d)	L (%)
1	10.0	5.0	9	13.89	2.64	1.5	0.29	19
2	2.5	7.5	12	68.18	8.98	5.7	0.75	13
3	2.5	2.5	6	77.78	4.33	13.0	0.72	6
4	5.0	5.0	9	13.89	2.29	1.5	0.25	17
5	5.0	5.0	9	13.89	1.60	1.5	0.18	12
6	7.5	2.5	6	22.22	1.56	3.7	0.26	7
7	5.0	5.0	9	13.89	1.25	1.5	0.14	9
8	7.5	2.5	12	11.36	1.59	0.9	0.13	14
9	5.0	5.0	9	13.89	0.21	1.5	0.02	2
10	2.5	7.5	6	11.11	8.50	1.9	1.42	76
11	7.5	7.5	6	33.33	2.39	5.6	0.40	7
12	0.0	5.0	9	361.11	327.06	40.1	36.34	91
13	5.0	0.0	9	13.89	2.99	1.5	0.33	22
14	7.5	7.5	12	34.09	0.45	2.8	0.04	1
15	5.0	5.0	15	27.78	2.99	1.9	0.20	11
16	2.5	2.5	12	55.56	3.52	4.6	0.29	6
17	5.0	5.0	9	13.89	0.56	1.5	0.06	4

18	5.0	5.0	9	13.89	4.03	1.5	0.45	29
19	5.0	5.0	3	55.56	3.52	18.5	1.17	6
20	5.0	10.0	9	13.89	4.03	1.5	0.45	29

CB: Concentración de biomasa; CL: Concentración de lípidos; PB: Productividad de biomasa; PL: Productividad de lípidos; L: Porcentaje de lípidos

6.6.1 Análisis de la regresión de superficie de respuesta para *N. oleoabundans*

Con los datos de las corridas experimentales fue posible realizar la regresión para encontrar las respuestas estadísticamente significativas (cuadro 12).

Cuadro 12. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta para *N. oleoabundans*.

Fuente	Respuestas									
	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4		Y_5	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Modelo	3.95	0.022	2.40	0.094	3.62	0.029	2.41	0.094	4.94	0.010
Lineal	5.43	0.018	2.95	0.085	5.40	0.018	2.98	0.083	5.97	0.013
X_1	16.27	0.002	8.84	0.014	13.06	0.005	8.92	0.014	14.95	0.003
X_2	0.01	0.921	0.00	0.961	0.07	0.803	0.00	0.956	2.08	0.180
X_3	0.02	0.881	0.00	0.989	3.08	0.110	0.02	0.890	0.89	0.367
Cuadrático	6.13	0.012	4.26	0.035	5.09	0.022	4.24	0.036	4.96	0.023
X_1^2	17.03	0.002	11.04	0.008	13.25	0.005	11.06	0.008	12.78	0.005
X_2^2	0.05	0.824	0.08	0.786	0.08	0.787	0.08	0.785	0.84	0.382

X_3^2	0.22	0.649	0.08	0.782	2.18	0.170	0.05	0.830	0.35	0.568
Interacción	0.30	0.824	0.00	1.000	0.37	0.775	0.00	1.000	3.90	0.044
$X_1 X_2$	0.39	0.548	0.00	0.951	0.62	0.448	0.00	0.951	5.26	0.045
$X_1 X_3$	0.10	0.757	0.00	0.992	0.00	0.957	0.00	0.973	2.62	0.136
$X_2 X_3$	0.41	0.535	0.00	0.997	0.49	0.501	0.00	0.979	3.82	0.079
Falta de ajuste	$3.1e^{25}$	0.000	3319.18	0.000	$3.89E^{+25}$	0.000	3309.0	0.000	2.93	0.132
R^2	78.06 %		68.40 %		76.51 %		68.42 %		81.65 %	
R^2 ajustada	58.32 %		39.96 %		55.37 %		40.00 %		65.14 %	

Y1: Concentración de biomasa; Y2: Concentración de lípidos; Y3: Productividad de biomasa; Y4: Productividad de lípidos; Y5: Porcentaje de lípidos

El modelo resultó estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) para la CB, PB y L; la respuesta está ampliamente influenciada por la concentración de acetato (X_1).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la falta de ajuste resultó significativa para todas las variables excepto L, por lo que el modelo no se ajusta a los datos con exactitud.

Las ecuaciones de regresión para las respuestas con significancia estadística obtenidas son:

$$Y_1 = 394 - 88.0X_1 - 19.3X_2 - 13.8X_3 + 6.58X_1^2 - 0.36X_2^2 + 0.52X_3^2 + 1.76X_1X_2 - 0.75X_1X_3 + 1.52X_2X_3$$

$$Y_3 = 69.2 - 10.64X_1 - 2.82X_2 - 5.48X_3 + 0.717X_1^2 - 0.055X_2^2 + 0.202X_3^2 + 0.276X_1X_2 - 0.016X_1X_3 + 0.203X_2X_3$$

$$Y_5 = 17.1 - 21.79X_1 + 18.51X_2 + 3.28X_3 + 1.588X_1^2 + 0.406X_2^2 - 0.182X_3^2 - 1.805X_1X_2 + 1.062X_1X_3 - 1.282X_2X_3$$

La figura 15 muestra la gráfica de la predicción en la CB, CL y PL del modelo desarrollado, contra los valores experimentales. Se visualiza la correlación entre el cultivo mixotrófico y la CB, CL y PL debido a que los valores predichos fueron cercanos a los valores observados.

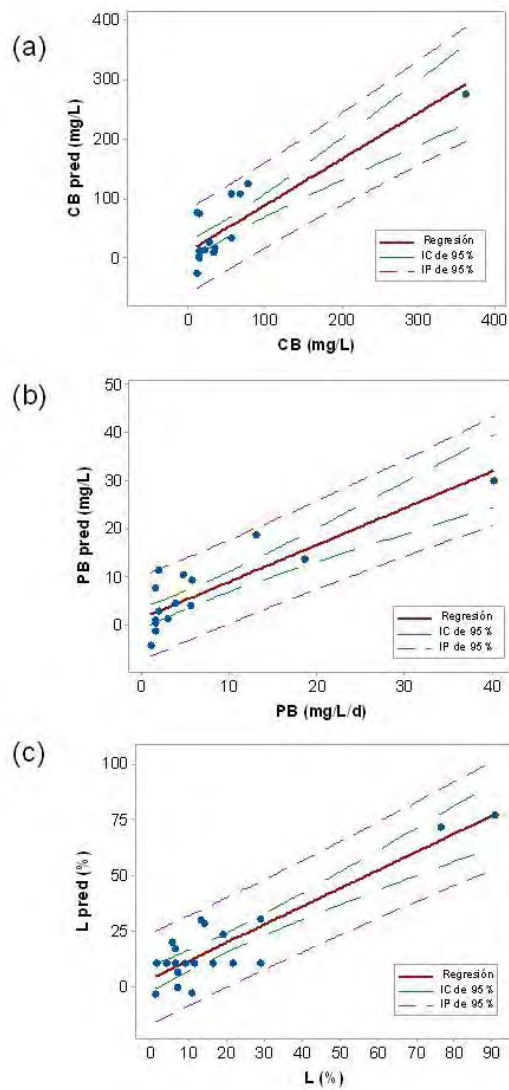


Figura 15. Gráficas de línea ajustada para la regresión de la superficie de respuesta de *N. oleoabundans*.

6.6.2. Análisis de las superficies de respuesta para *N. oleoabundans*

La figura 16 muestra las superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contornos de las variables con significancia estadística para el modelo.

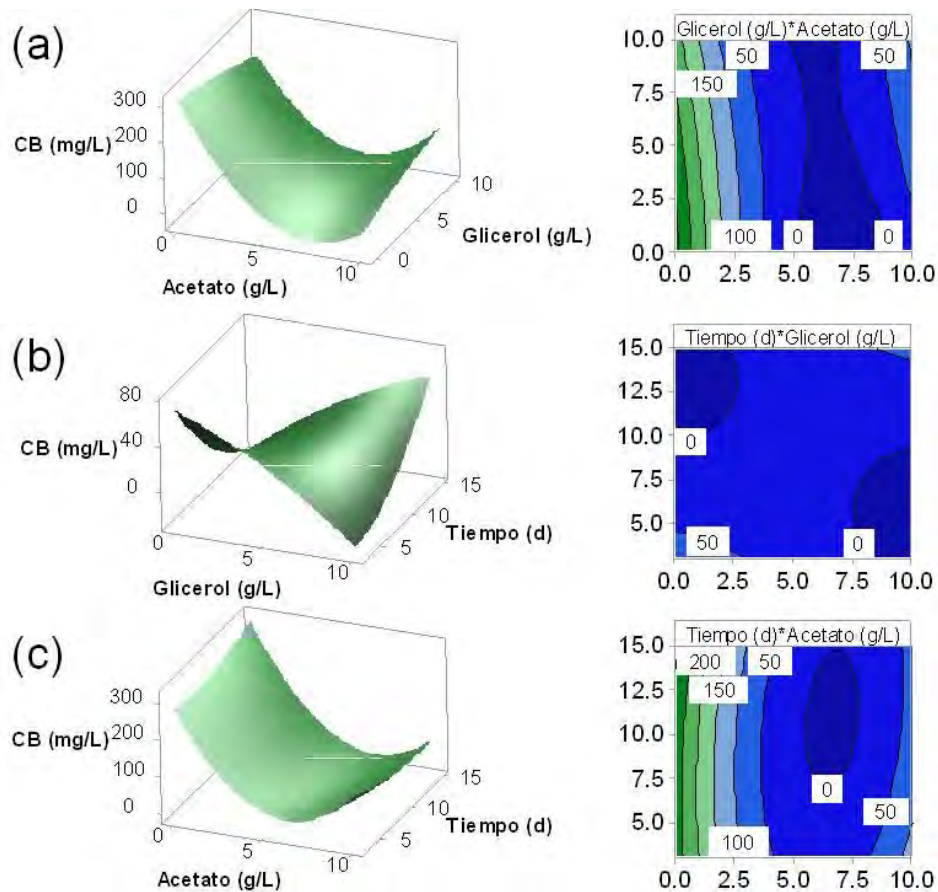


Figura 16. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de biomasa (CB) de *N. oleoabundans* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

La interacción entre la concentración de glicerol y acetato es antagonista, como se puede observar en la superficie de respuesta (figura 16a), ya que sólo cuando la concentración de acetato está muy próxima a cero se puede apreciar el valor más alto de CB.

La figura 16(b) muestra que no hay aumento en la CB en la interacción del glicerol y el tiempo debido a que estos se encuentran en el nivel medio de la concentración de acetato, es decir a 5 g/L, y como se mencionó anteriormente, el acetato es el factor que más influye sobre la CB, aunque en forma inversa, por ello las superficies muestran la forma de valle en lugar de colina. La figura 16(c) lo vuelve

a comprobar ya que se observa que, a altas concentraciones del acetato, la CB disminuye e incluso llega a ser cero, lo cual implica que podría haber muerte de *N. oleoabundans*.

Este mismo comportamiento se observa en las superficies de respuesta para PB (figura 17).

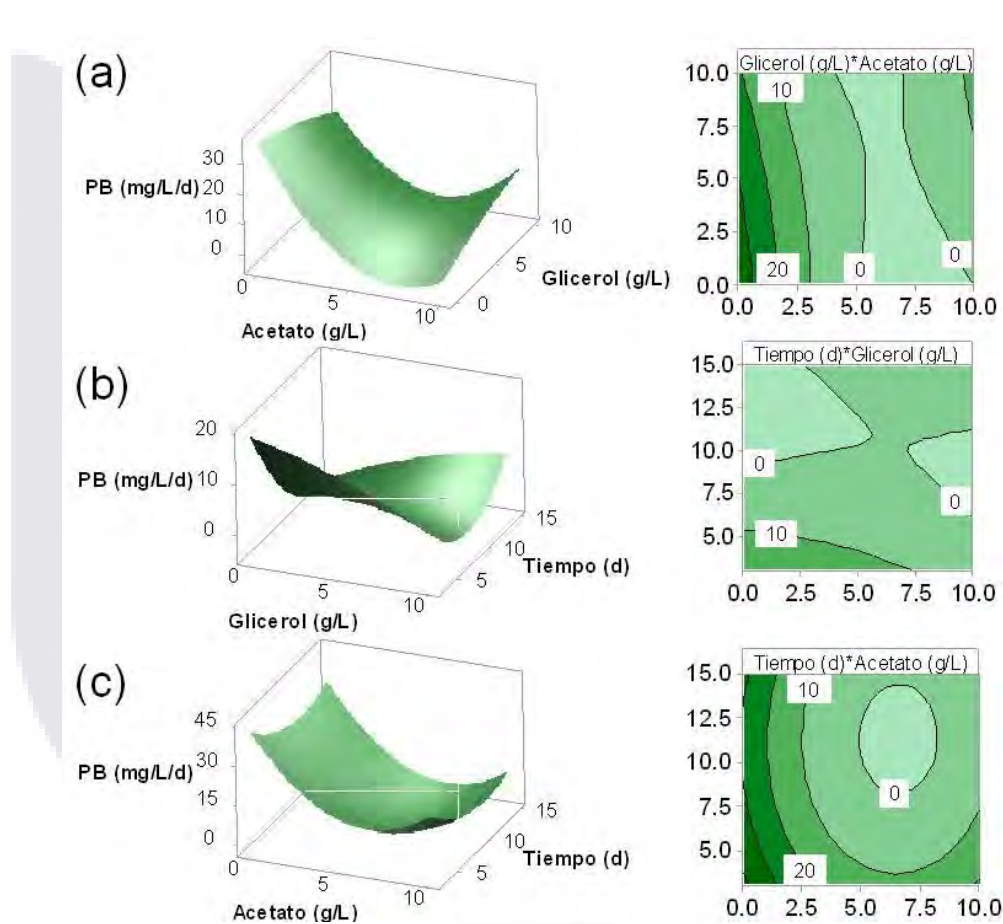


Figura 17. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración productiva de biomasa (PB) de *N. oleoabundans* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

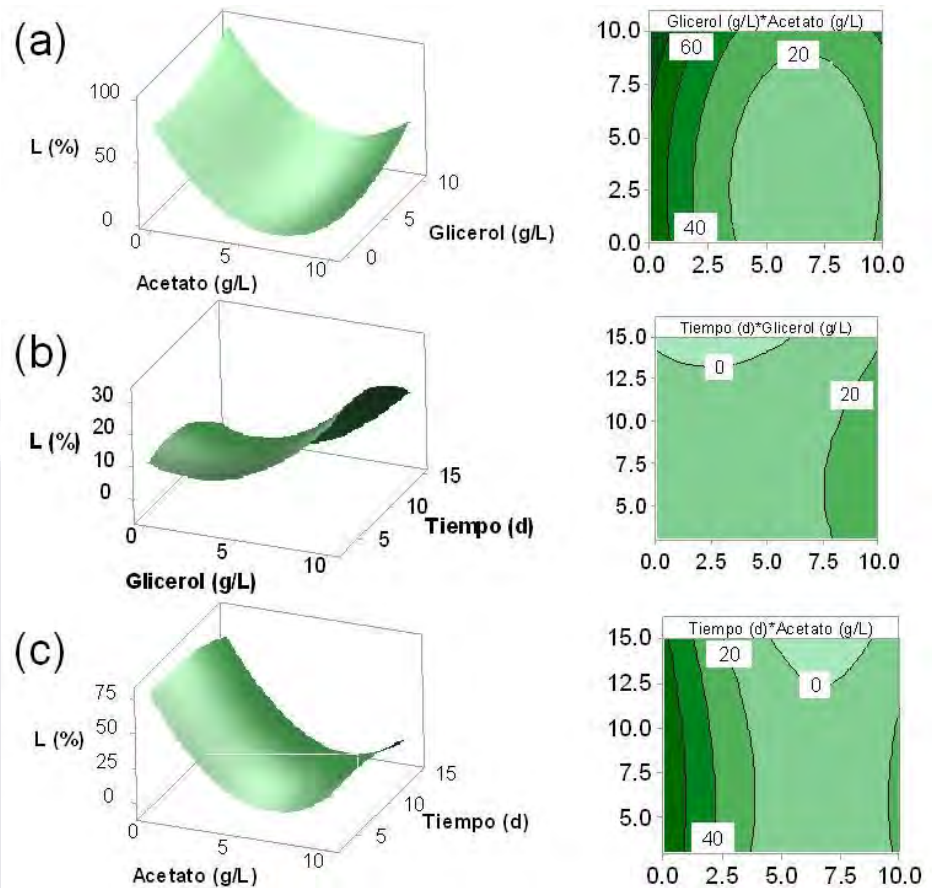


Figura 18. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre el porcentaje de lípidos (L) de *N. oleoabundans* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 9 d; (b) glicerol y tiempo a 5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 5 g/L de glicerol.

La figura 18 vuelve a mostrar que el aumento de L se encuentra en los niveles más bajos de la concentración de acetato aunado a los niveles más altos de glicerol, sin embargo, en la interacción con respecto al tiempo, L se mantiene prácticamente igual desde el inicio del experimento hasta el final de este.

6.6.3. Desarrollo de las condiciones óptimas del cultivo mixotrófico para *N. oleoabundans*

Para identificar la combinación de acetato, glicerol y tiempo que podría aportar valores máximos para todas las respuestas estadísticamente significativas, se realizó un análisis de optimización de la respuesta.

La corrida de confirmación se estableció en 7 g/L de glicerol y 3 días de tiempo de cultivo, sin adición de acetato de sodio, de acuerdo con el diagrama de optimización, que predijo valores máximos de 236 ± 102 mg / L de CB, 36.40 ± 12.70 mg/L/d de PB, y 82.60 ± 20 % de L. Los datos experimentales para la corrida de confirmación se obtuvieron junto con un cultivo de control (cuadro 13).

Cuadro 13. Validación del modelo de MSR de *N. oleoabundans*.

Respuestas	Control*	Condiciones óptimas**
Concentración de biomasa (mg/L)	144.44 ± 9.62	366.67 ± 76.38
Productividad de biomasa (mg/L/d)	31.48 ± 3.21	105.56 ± 25.46
Lípidos (%)	40.23 ± 3.36	80.10 ± 1.77

*Medio BBM y 3 días de tiempo de cultivo

**Medio BBM adicionado con 7 g/L de glicerol y 3 días de tiempo de cultivo

Todos los valores representan la media \pm desviación estándar con $n = 3$

La CB y PB superaron los valores predichos mientras que para L el resultado fue muy cercano al valor de la predicción; asimismo, se observó un aumento de entre 2 a 3 veces los resultados de los cultivos en las condiciones óptimas comparados con los cultivos control.

6.7. Efecto del cultivo mixotrófico sobre la biomasa y los lípidos de *N. muscorum*

En el caso de *N. muscorum* se realizó un diseño Box-Behnken de la MSR, ya que en este tipo de diseño se siguen manteniendo los tres factores, pero se tienen menos puntos de diseño con lo que se reducen los costos al realizar los experimentos. Esto fue debido a que el procesamiento de las muestras de *N. muscorum* no pudo hacerse por centrifugación debido a la flotación de las células, sino que fue necesario comprar filtros especiales para aplicar filtración. Además, se acortó el periodo de tiempo del experimento ya que las cianobacterias crecen más rápido que las algas (Majhi, 2024).

Se realizaron 15 corridas experimentales de acuerdo al Box-Behnken de la MSR; la matriz del diseño y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Cuadro 14. Matriz del diseño Box-Behnken de la MSR con las respuestas observadas en el cultivo mixotrófico de *N. muscorum*.

Corrida	Factores			Respuestas observadas				
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
	Acetato (g/L)	Glicerol (g/L)	Tiempo (d)	CB (mg/L)	CL (mg/L)	PB (mg/L/d)	PL (mg/L/d)	L (%)
1	0.0	2.5	2	90	5	15	1.3	5.0
2	2.5	2.5	6	320	16	43	2.4	5.0
3	0.0	0.0	6	150	8	15	0.9	5.0
4	2.5	0.0	10	340	14	28	1.2	4.0
5	5.0	2.5	2	118	2	29	0.3	2.0
6	5.0	0.0	6	200	12	23	1.7	6.0
7	2.5	2.5	6	470	14	68	2.0	3.0
8	2.5	0.0	2	65	4	2	1.0	6.0

9	0.0	2.5	10	760	20	70	1.8	2.6
10	2.5	5.0	2	75	5	7	1.3	6.0
11	5.0	5.0	6	150	5	15	0.4	3.0
12	2.5	5.0	10	450	9	39	0.7	2.0
13	0.0	5.0	6	130	17	12	2.5	13.0
14	5.0	2.5	10	640	13	58	1.1	2.0
15	2.5	2.5	6	440	21	63	3.2	4.8

CB: Concentración de biomasa; CL: Concentración de lípidos; PB: Productividad de biomasa; PL: Productividad de lípidos; L: Porcentaje de lípidos

6.7.1 Análisis de la regresión de superficie de respuesta para *N. muscorum*.

Con los datos anteriormente presentados fue posible realizar la regresión para encontrar las respuestas estadísticamente significativas (cuadro 15).

Cuadro 15. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta para *N. muscorum*.

Fuente	Respuestas									
	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4		Y_5	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Modelo	5.93	0.032	5.67	0.035	7.05	0.022	4.19	0.065	3.74	0.08
Lineal	12.39	0.009	8.43	0.021	7.80	0.025	2.07	0.224	3.59	0.101
X_1	0.01	0.945	3.93	0.104	0.21	0.664	5.77	0.061	7.18	0.044
X_2	0.03	0.875	0.06	0.819	0.02	0.889	0.01	0.908	0.41	0.552

X_3	37.13	0.002	21.31	0.006	23.17	0.005	0.41	0.551	3.19	0.134
Cuadrático	5.16	0.055	5.58	0.047	12.78	0.009	7.01	0.031	3.67	0.098
X_1^2	0.56	0.489	2.11	0.206	2.83	0.153	4.87	0.078	0.26	0.631
X_2^2	14.39	0.013	7.87	0.038	36.47	0.002	6.02	0.058	5.57	0.065
X_3^2	0.36	0.573	8.99	0.030	1.34	0.300	13.08	0.015	4.37	0.091
Interacción	0.24	0.866	2.98	0.135	0.56	0.664	3.49	0.106	3.94	0.087
$X_1 X_2$	0.02	0.894	7.56	0.040	0.06	0.821	9.60	0.027	10.95	0.021
$X_1 X_3$	0.48	0.520	0.68	0.448	1.54	0.270	0.16	0.703	0.52	0.503
$X_2 X_3$	0.22	0.660	0.72	0.436	0.08	0.786	0.70	0.441	0.36	0.574
Falta de ajuste	2.36	0.312	0.57	0.686	0.38	0.782	0.51	0.715	3.13	0.252
R^2		91.43%		91.07%		92.69%		88.28%		87.05%
R^2 ajustada		76.01%		75.00%		79.54%		67.19%		63.75%

Y1: Concentración de biomasa; Y2: Concentración de lípidos; Y3: Productividad de biomasa; Y4: Productividad de lípidos; Y5: Porcentaje de lípidos

El análisis de regresión de los resultados experimentales indicó que el modelo es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para las variables de respuesta CB, CL Y PL; la CB se ve mayormente influenciada por la concentración de acetato de sodio y el tiempo, la CL se ve influenciada por la adición de acetato de sodio, mientras que la PL se ve afectada por el tiempo y la interacción entre el glicerol y el acetato de sodio.

En el caso de *N. muscorum*, se realizó la reducción del modelo para Y_1 , Y_2 e Y_3 , por el método de eliminación hacia atrás, con el fin de aumentar la precisión de las predicciones; en el siguiente cuadro se muestra el resumen del ANOVA después de la reducción.

Cuadro 16. Resumen del ANOVA de la regresión de superficie de respuesta con los modelos reducidos, para *N. muscorum*.

Fuente	Respuestas					
	Y_1		Y_2		Y_3	
	F	p	F	p	F	p
Modelo	12.27	0.001	7.45	0.006	12.32	0.001
Lineal	17.33	0.001	7.94	0.009	9.34	0.005
X_1	0.01	0.934	3.70	0.091	0.25	0.627
X_2	0.04	0.850	0.05	0.821	0.03	0.877
X_3	51.95	0.000	20.06	0.002	27.75	0.001
Cuadrático	7.21	0.012	6.89	0.018	15.30	0.001
X_1^2	0.78	0.403	NS	NS	3.39	0.103
X_2^2	20.13	0.002	6.87	0.031	43.68	0.000
X_3^2	0.51	0.496	7.89	0.023	1.60	0.242
Interacción	NS	NS	7.11	0.028	NS	NS
$X_1 X_2$	NS	NS	7.11	0.028	NS	NS
$X_1 X_3$	NS	NS	NS	NS	NS	NS

$X_2 X_3$	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Falta de ajuste	1.39	0.474	0.72	0.680	0.36	0.857
R^2	90.20%		84.82%		90.24%	
R^2 ajustada	82.85%		73.44%		82.91%	

Y1: Concentración de biomasa; Y2: Concentración de lípidos; Y3: Productividad de biomasa; NS: No significativo

La ecuación de regresión que describe el modelo para la concentración de biomasa es la siguiente:

$$Y_1 = -116 + 32.1X_1 + 171.3X_2 + 32.4X_3 - 6.64X_1X_1 - 33.76 X_2X_2 + 2.09X_3 X_3$$

La ecuación de regresión que describe el modelo para la concentración de lípidos es:

$$Y_2 = -8.43 + 0.828X_1 + 5.03X_2 + 4.72X_3 - 0.689X_2X_2 - 0.289X_3 X_3 - 0.676X_1X_2$$

La ecuación de regresión que describe el modelo para la productividad de biomasa es la siguiente:

$$Y_3 = -27.1 + 8.02X_1 + 26.55X_2 + 9.18X_3 - 1.467X_1X_1 - 5.267X_2X_2 - 0.394X_3 X_3$$

La figura 19 muestra la gráfica de la predicción en la CB, CL y PB del modelo desarrollado, contra los valores experimentales. Se visualiza la correlación entre el

cultivo mixotrófico y la CB, CL y PB debido a que los valores predichos fueron cercanos a los valores observados.

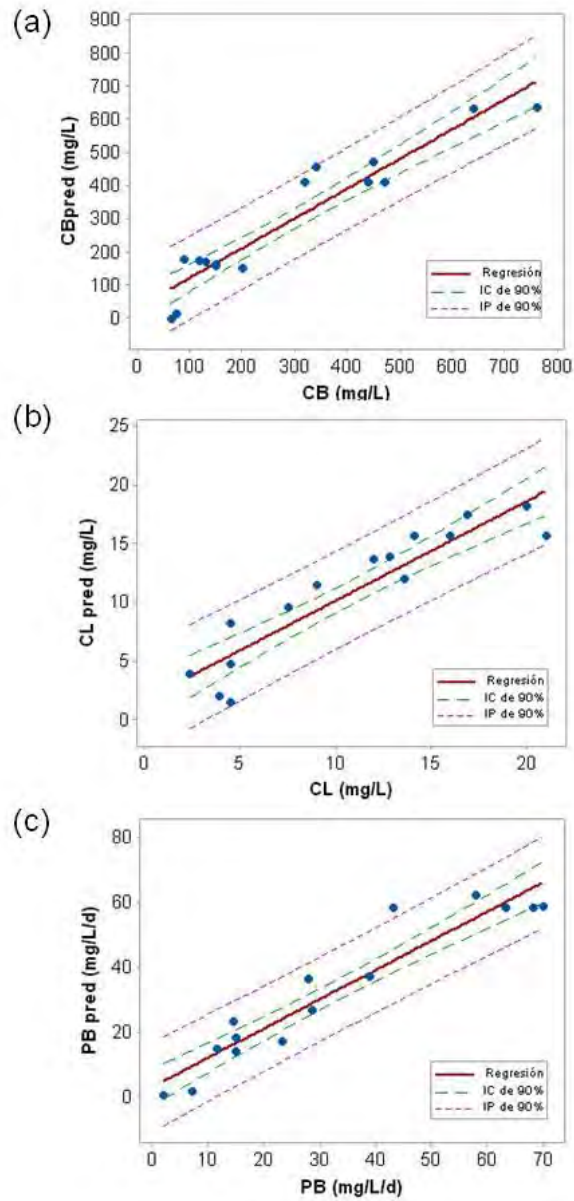


Figura 19. Gráficas de línea ajustada para la regresión de la superficie de respuesta de *N. muscorum*.

6.7.2. Análisis de las superficies de respuesta para *N. muscorum*

Los efectos interactivos de los factores se pueden observar en las gráficas mostradas en la figura 20. Las gráficas de superficie de respuesta y de contornos muestran que hay un incremento de la concentración de biomasa a medida que aumenta el tiempo de cultivo, y que con respecto a la combinación de las fuentes de carbono (acetato de sodio y glicerol), la localización del punto óptimo se encuentra en los niveles centrales.

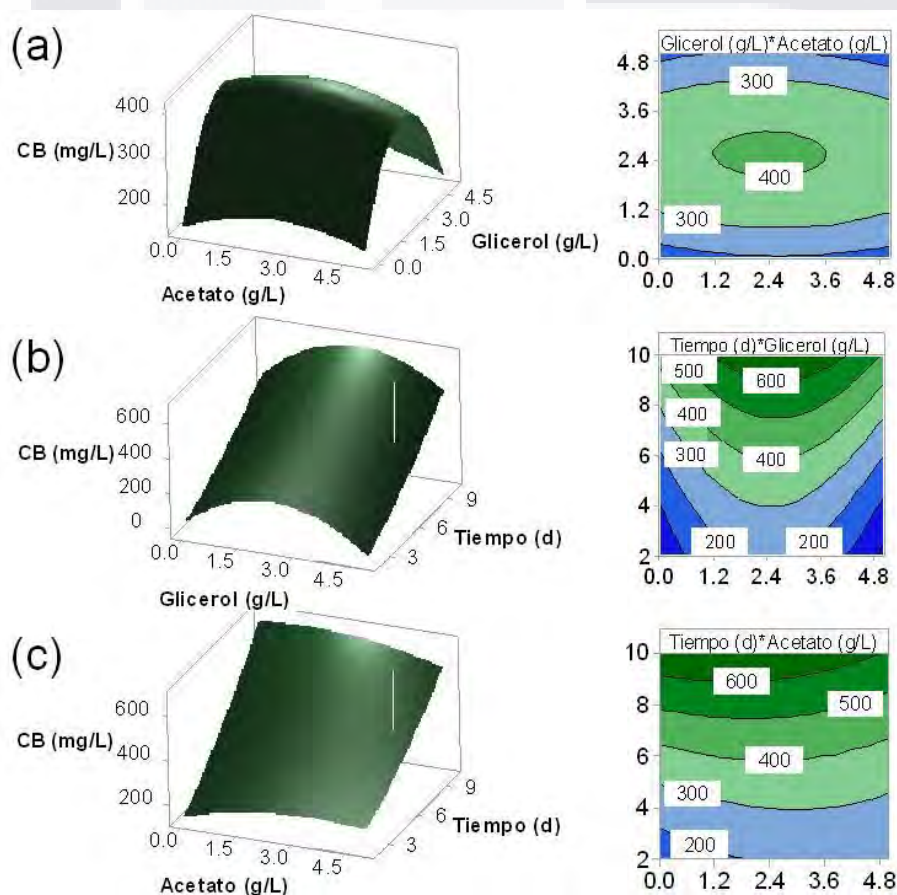


Figura 20. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de biomasa (CB) de *N. muscorum* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 6 d; (b) glicerol y tiempo a 2.5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 2.5 g/L de glicerol.

La CL tiende a aumentar en los niveles altos de glicerol y bajos de acetato (figura 21a); la interacción del glicerol con el tiempo en la figura 21(b) también muestra incremento de la CL del sexto al décimo día de cultivo, y la superficie de respuesta se aprecia tipo colina, con un punto donde hay máxima producción en los niveles medios de glicerol, a diferencia de la interacción con el acetato, donde la máxima CL se aprecia en los niveles bajos (figura 21c).

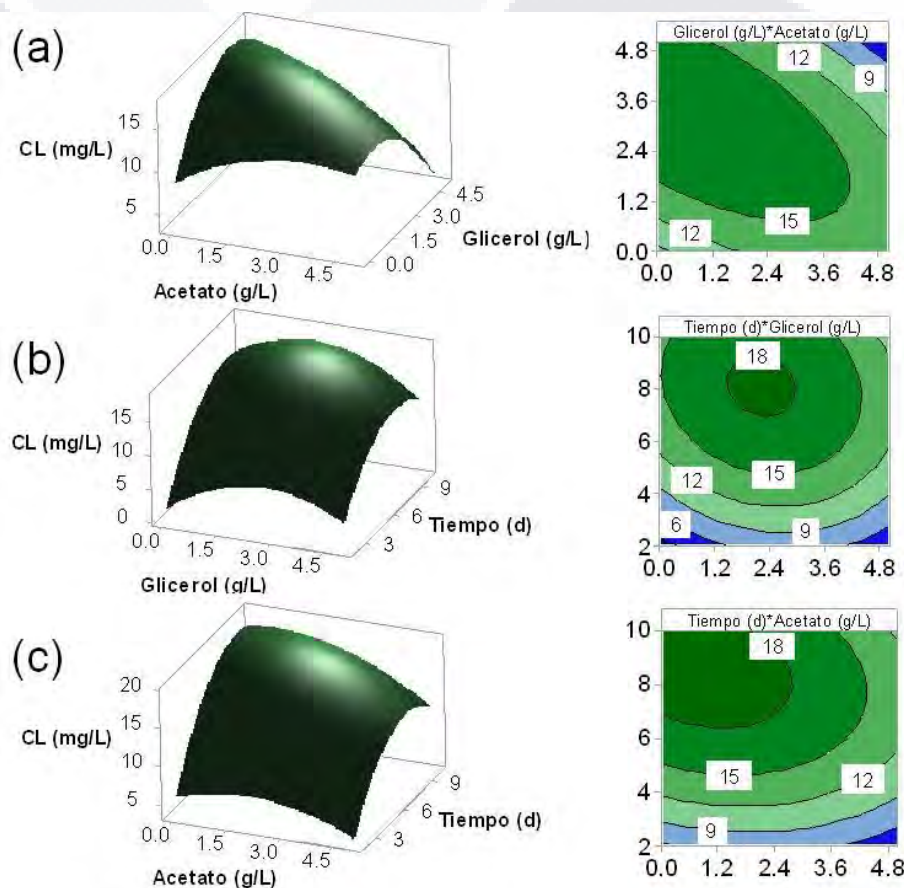


Figura 21. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la concentración de lípidos (CL) de *N. muscorum* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 6 d; (b) glicerol y tiempo a 2.5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 2.5 g/L de glicerol.

La PB está directamente relacionada con la CB, por lo que el comportamiento de las superficies de respuesta es el mismo que el descrito para CB (figura 22).

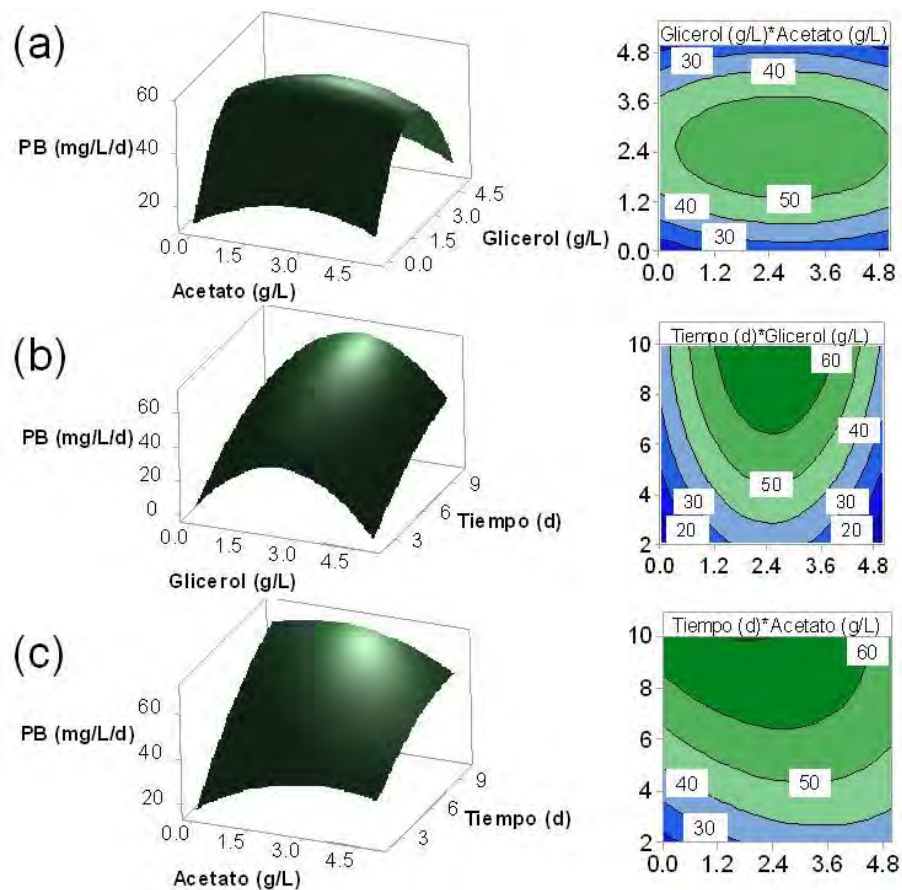


Figura 22. Superficies de respuesta y sus correspondientes gráficas de contorno a la derecha. Efectos interactivos sobre la productividad de biomasa (PB) de *N. muscorum* de: (a) glicerol y acetato de sodio en un tiempo de 6 d; (b) glicerol y tiempo a 2.5 g/L de acetato de sodio, y (c) acetato de sodio y tiempo a 2.5 g/L de glicerol.

6.7.3. Desarrollo de las condiciones óptimas del cultivo mixotrófico para *N. muscorum*

Se realizó un análisis de optimización de la respuesta para las respuestas estadísticamente significativas.

La corrida de confirmación se estableció en 0.78 g/L de acetato de sodio, 2.78 g/L de glicerol y 10 días de tiempo de cultivo, de acuerdo con el diagrama de optimización, que predijo los valores máximos 682.90 ± 75.50 mg/L de CB, 68.56 ± 7.40 mg/L/d de PB, y 18.60 ± 2.17 mg/L de CL. Los datos experimentales para la corrida de confirmación se obtuvieron junto con un cultivo de control (cuadro 17).

Cuadro 17. Validación del modelo de MSR de *N. muscorum*.

Respuestas	Control*	Condiciones óptimas**
Concentración de biomasa (mg/L)	216.67 ± 28.87	588.89 ± 13.88
Concentración de lípidos (mg/L)	15.14 ± 1.53	48.53 ± 7.55
Productividad de biomasa (mg/L/d)	15.57 ± 2.89	52.79 ± 1.39

*Medio BG-11 y 10 días de tiempo de cultivo

**Medio BG-11 adicionado con 0.78 g/L de acetato, 2.78 g/L de glicerol y 10 días de tiempo de cultivo

Todos los valores representan la media \pm desviación estándar con $n = 3$

En esta especie, los resultados obtenidos en las condiciones óptimas para CB y PB resultaron menores al valor de predicción, pero la CL arrojó resultados de más del doble; con respecto a los cultivos control, en todas las respuestas analizadas, con el cultivo mixotrófico se lograron mejores resultados.

6.8. Obtención de biodiésel a través de transesterificación *in situ* y análisis de la composición de ácidos grasos presentes

La biomasa seca obtenida de la validación de las condiciones de optimización fue sometida a transesterificación *in situ*, en condiciones ácidas, de acuerdo con el protocolo descrito por Richmond (2013) sin adición de estándar interno para el análisis de composición de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs). Los FAMEs fueron disueltos en hexano para ser analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). La identificación y el contenido de FAMEs se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención y cuantificación de iones con los correspondientes al estándar (Supelco™ 37 component FAME mix, Sigma Aldrich Co.). Los componentes del estándar se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 18. Componentes en el estándar para la identificación y cuantificación de FAMEs

FAME	Abreviatura	Registro CAS
EM del ácido caproico	C6:0	106707
EM del ácido caprílico	C8:0	111115
EM del ácido cáprico	C10:0	110429
EM del ácido undecanoico	C11:0	1731868
EM del ácido láurico	C12:0	111820
EM del ácido tridecanoico	C13:0	1731880
EM del ácido mirístico	C14:0	124107
EM del ácido miristoleico	C14:1n5	56219068
EM del ácido pentadecílico	C15:0	7132641

EM del ácido palmítico	C16:0	112390
EM del ácido palmitoleico	C16:1n7	1120258
EM del ácido margárico	C17:0	1731926
EM del ácido cis-10-heptadecanoico	C17:1n7	75190828
EM del ácido esteárico	C18:0	112618
EM del ácido elaídico	C18:1n9t	1937628
EM del ácido oléico	C18:1n9c	112629
EM del ácido linolelaídico	C18:2n6t	2566974
EM del ácido α -linoléico	C18:2n6c	112630
EM del ácido linolénico	C18:3n3	301008
EM del ácido γ -linolénico	C18:3n6	16326322
EM del ácido araquídico	C20:0	1120281
EM del ácido 11-cis eicosadienoico	C20:1n9	2390092
EM del ácido cis-11,14-eicosadienoico	C20:2n6	2463027
EM del ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico	C20:3n3	55682887
EM del ácido 8,11,14-cis eicosatrienoico	C20:3n6	21061109
EM del ácido araquidónico	C20:4n6	2566894
EM del ácido cis 5,8,11,14,17 cis eicosapentaenoico (EPA)	C20:5n3	2734476
EM del ácido heneicosanoico	C21:0	6064900
EM del ácido behénico	C22:0	929771

EM del ácido erúcico	C22:1n9	1120349
EM del ácido cis-13,16-docosadienoico	C22:2n6	61012473
EM del ácido cis 4,7,10,13,16,19 docosahexanoico (DHA)	C22:6n3	2566907
EM del ácido tricosanoico	C23:0	2433978
EM del ácido lignocérico	C24:0	2442491
EM del ácido nervónico	C24:1n9	2733882

FAME: Éster metílico de ácido graso
EM: Éster metílico

La composición del biodiésel obtenido por transesterificación *in situ*, en esta Fase I del proyecto se muestra en el cuadro 19. Se observa que la composición es diferente no sólo entre las especies de estudio, sino, para cada especie, dependiendo del medio de cultivo en el cual crecieron.

Cuadro 19. Identificación y cuantificación de FAMES obtenidos por transesterificación *in situ*.

FAMES	FAMES (mg/gBS)					
	<i>C. vulgaris</i>		<i>N. oleoabundans</i>		<i>N. muscorum</i>	
	Control ^a	Medio optimizado ^b	Control ^c	Medio optimizado ^d	Control ^e	Medio optimizado ^f
C10:0	ND	ND	ND	ND	0.17	0.05
C11:0	ND	ND	ND	ND	0.03	ND
C12:0	ND	ND	ND	ND	ND	0.10
C14:0	ND	ND	ND	ND	0.57	0.40
C15:0	0.48	0.28	1.50	0.68	0.25	0.14
C16:0	2.35	7.62	7.88	1.81	ND	ND
C17:0	ND	0.51	3.75	ND	0.46	0.24
C17:1n7	ND	0.51	ND	ND	1.03	0.91
C18:0	1.91	3.83	5.38	2.19	1.64	1.54
C18:1n9t	1.48	0.62	3.75	2.19	9.67	ND

C18:1n9c	2.83	12.31	7.25	2.28	0.06	ND
C18:2n6c	6.42	2.22	ND	ND	18.65	21.06
C18:3n3	3.61	4.11	10.88	ND	8.56	14.65
C20:0	ND	0.90	ND	ND	0.08	ND
C13:0	ND	ND	ND	ND	0.04	0.00
C20:1n9	ND	1.01	7.00	ND	ND	ND
C20:2n6	ND	ND	ND	ND	0.10	0.20
C20:3n6	ND	1.69	ND	ND	ND	ND
C20:4n6	3.53	1.36	10.88	ND	0.00	0.80
C20:3n3	ND	ND	ND	ND	0.10	0.25
C22:0	ND	ND	ND	ND	0.02	0.08
C22:1n9	ND	1.27	ND	ND	0.04	ND
C20:5n3	ND	1.36	ND	ND	0.01	ND
C24:0	ND	ND	ND	ND	ND	0.41
C24:1n9	4.47	1.59	12.50	7.00	0.01	0.20
C22:6n3	ND	0.56	ND	ND	0.00	ND

BS: Biomasa seca. ND: No detectado

a: Medio BBM, 12 días de cultivo

b: Medio BBM adicionado con 10 g/L de acetato de sodio y 0.74 g/L de glicerol, 12 días de cultivo.

c: Medio BBM, 3 días de cultivo

d: Medio BBM adicionado con 7 g/L de glicerol, 3 días de tiempo de cultivo

e: Medio BG-11, 10 días de cultivo

f: Medio BG-11 adicionado con 0.78 g/L de acetato, 2.78 g/L de glicerol, 10 días de tiempo de cultivo.

Los datos representan la media de tres experimentos independientes. La desviación estándar mínima fue de 0.04 y la máxima de 5.74.

Los resultados de los principales componentes del biodiésel para los tratamientos de cada especie se presentan como porcentajes del total de ácidos grasos (figura 23).

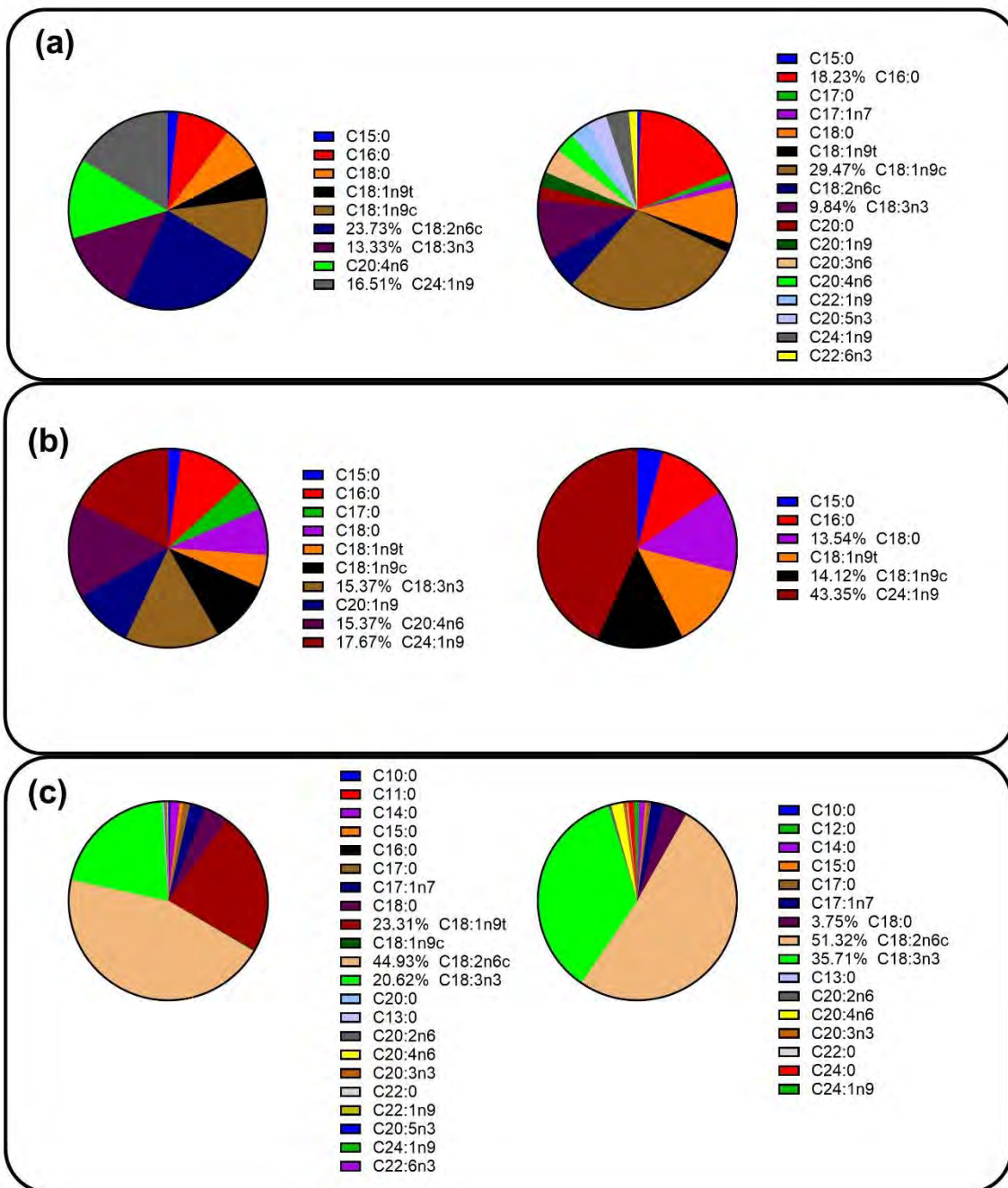


Figura 23. Distribución porcentual de ácidos grasos en el biodiésel obtenido por transesterificación *in situ* de: a) *C. vulgaris*; b) *N. oleoabundans*; y, c) *N. muscorum*, cultivadas en sus respectivos medios control (izquierda) y en medios optimizados (derecha). Se muestran en las leyendas los resultados de los tres mayores constituyentes de cada tratamiento. Los datos son la media de tres experimentos independientes.

En la figura 23(a) se puede apreciar que para *C. vulgaris* dentro de los componentes principales está el ácido α -linolénico (C18:3n3), tanto para el tratamiento control como el del cultivo mixotrófico, y corresponde a un rendimiento de 3.61 y 4.11 mg/g de biomasa seca. En el cultivo control, otros componentes presentes en cantidad importante son el ácido linoléico (C18:2n6c) y el ácido nervónico (C24:1n9), con rendimientos de 6.42 y 4.47 mg/g de biomasa seca. Para el cultivo mixotrófico, se encontraron el ácido oléico (C18:1n9c) y el ácido palmítico (C16:0), con 12.31 y 7.62 mg/g de biomasa seca, respectivamente.

En la figura 23(b), para *N. oleoabundans*, el componente mayoritario es el mismo en ambos tratamientos, el ácido nervónico (C24:1n9); aunque en la proporción dentro del tratamiento control alcanza 17.76 % mientras que para el optimizado un 43.13 %, la cantidad obtenida es mayor, con un 12.50 mg/g en tanto que para el optimizado se obtuvieron 7 mg/g.

Para *N. muscorum*, se observa una clara predominancia en la composición con el ácido linoleico (C18:2n:6c) y el α -linolénico (C18:3n3), lo que se puede apreciar en la figura 23(c). En el cultivo control, se logró un 45 % (18.65 mg/g) y un 21% (8.56 mg/g), respectivamente. Para el cultivo mixotrófico, el porcentaje es un poco mayor, 51 % (21.06 mg/g) y 36 % (14.65 mg/g), respectivamente.

6.9. Producción de lípidos inducida por condiciones de estrés en los cultivos optimizados

Una vez validadas las condiciones óptimas de cultivo mixotrófico para cada especie, se procedió a realizar los experimentos para ver el efecto del estrés por deficiencia de nitrógeno y por aumento en la salinidad, bajo cuatro tratamientos distintos y el medio optimizado que sirvió como control, por cinco días posteriores al cultivo mixotrófico optimizado.

A los datos de la producción de lípidos se les realizó un ANOVA de dos vías, teniendo como factores la especie y el tratamiento; los resultados mostraron que existe diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) tanto en la especie y el tratamiento, como en la interacción entre ambos sobre el porcentaje de lípidos (cuadro 20).

Cuadro 20. ANOVA del porcentaje de lípidos de *C. vulgaris*, *N. oleoabundans* y *N. muscorum* cultivadas en sus medios optimizados y sometidas a condiciones de estrés.

Fuente de variación	% de la variación total	<i>P</i>	Resumen <i>P</i>	¿Significativo?
Interacción	26.12	<0.0001	****	Sí
Especie	42.43	<0.0001	****	Sí
Tratamiento	23.61	<0.0001	****	Sí

ANOVA	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	<i>F</i>	<i>P</i>
Interacción	1133	8	141.7	6.799	$P < 0.0001$
Especie	1841	2	920.4	44.18	$P < 0.0001$
Tratamiento	1024	4	256.0	12.29	$P < 0.0001$
Residual	520.8	25	20.83		

Se realizó una prueba de Dunett para identificar las diferencias significativas entre el control y los tratamientos de los cultivos en condiciones de estrés (figura 24).

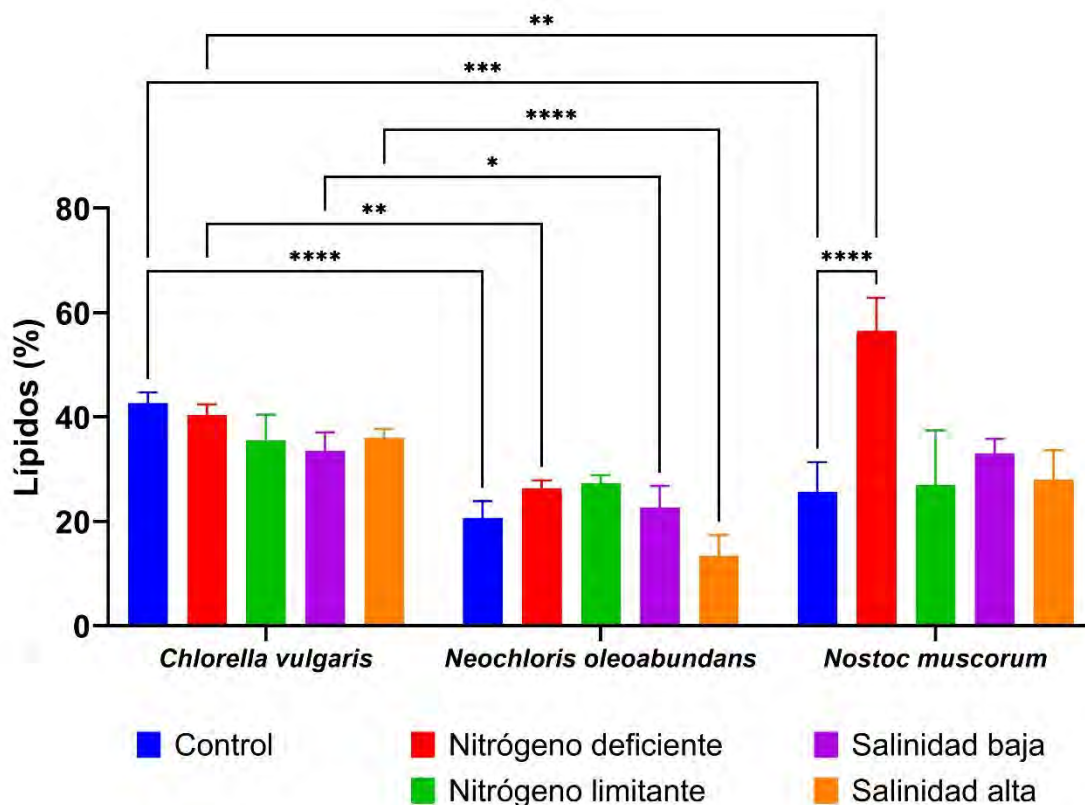


Figura 24. Distribución porcentual de lípidos de *C. vulgaris*, *N. oleoabundans* y *N. muscorum* en cultivo mixotrófico optimizado y sometidas a condiciones de estrés. Las diferencias estadísticamente significativas (*) corresponden a la comparación entre especies y entre los tratamientos con respecto al control. Se muestran resultados de tres experimentos independientes. Las barras corresponden a una desviación estándar.

Solamente para *N. muscorum* hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos probados al interior de la especie; el tratamiento con nitrógeno deficiente produjo mayor cantidad de lípidos con respecto al control.

Con respecto a las comparaciones entre especies, tanto el tratamiento control como el de nitrógeno deficiente tuvieron diferencia estadísticamente significativa a diferencia del nitrógeno limitante, ya que en todas las especies se observó que no hubo diferencia significativa. En cuanto a los tratamientos con estrés por salinidad se observó que sólo hay diferencia entre *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*.

6.10. Efecto de las condiciones de estrés en la composición de los ácidos grasos

La biomasa cosechada después de los tratamientos en condiciones de estrés, se sometió a transesterificación *in situ* y *ex situ*, y se realizó la identificación y cuantificación de los componentes del biodiésel.

El cuadro 21 presenta la cantidad de ácidos grasos con respecto a la biomasa seca de *C. vulgaris*, mientras que en la figura 25, se observan en términos de porcentaje del total de ácidos grasos en cada condición. Se puede observar que para *C. vulgaris*, el biodiésel obtenido por transesterificación *in situ* muestra diferente composición con respecto al obtenido por transesterificación *ex situ*. En el caso de la primera, el componente mayoritario en todos los tratamientos fue el ácido eláidico (C18:1n9t) con porcentajes entre el 23 y el 26 %, excepto en el de cultivo con nitrógeno limitante, en el que fue el ácido palmítico (C16:0) con 25 %. En la transesterificación *ex situ*, los tres principales componentes son los mismos en todos los tratamientos: el ácido palmítico, el ácido estéarico (C18:0) y el ácido α -linolénico (C18:3n3); este último se encuentra en mayor porcentaje, del 37 al 55 % en todos los tratamientos, excepto en el de salinidad baja, en el que el mayor porcentaje lo tiene el ácido palmítico con 36 %.

Otra observación importante es que el ácido palmítico se encuentra dentro de los tres mayores constituyentes en todos los tratamientos para *C. vulgaris*, independientemente del método de transesterificación aplicado.

Cuadro 21. Identificación y cuantificación de FAMEs de *C. vulgaris* bajo condiciones de estrés.

FAMEs	FAMEs (mg/gBs)									
	Medio optimizado		Nitrógeno deficiente		Nitrógeno limitante		Salinidad baja		Salinidad alta	
	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>
C15:0	0.42	0.38	0.51	0.46	0.51	0.38	0.47	0.32	0.41	0.28
C16:0	11.60	7.86	13.58	8.01	11.99	7.97	11.52	6.59	11.17	7.46
C16:1n7	ND	0.58	ND	0.61	ND	0.50	ND	0.46	ND	0.51
C17:0	0.57	0.33	0.60	0.44	0.59	0.29	0.53	0.28	0.51	0.29
C17:1n7	0.52	ND	0.50	ND	0.53	ND	0.45	ND	0.44	ND
C18:0	6.14	3.99	6.69	3.77	6.14	4.08	5.84	3.03	5.67	3.62
C18:1n9t	20.64	0.23	16.69	0.34	0.81	0.19	16.83	0.21	15.46	0.20
C18:1n9c	8.60	0.23	15.12	0.31	10.77	0.18	15.18	0.19	6.66	0.19
C18:2n6c	ND	ND	1.87	ND	2.14	ND	1.81	ND	1.79	ND
C18:3n6	ND	0.30	ND	ND	ND	0.22	1.13	0.22	1.08	0.21
C18:3n3	13.21	19.85	6.45	10.32	5.82	10.87	3.40	4.36	5.20	9.17
C20:0	0.83	ND	0.77	0.72	0.88	0.20	0.73	ND	0.717	ND
C13:0	ND	0.02	0.02	ND	ND	0.03	ND	0.02	ND	0.03
C20:1n9	0.99	ND	0.97	ND	0.97	ND	0.91	ND	0.97	ND

C20:2n6	ND	0.39	1.11	ND	ND	ND	1.06	0.75	1.10	0.37
C21:0	ND	ND	1.21	ND	ND	ND	ND	ND	1.20	ND
C20:3n6	ND	ND	ND	0.40	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C20:4n6	1.26	0.37	1.17	0.53	1.33	0.31	1.09	0.30	1.10	0.29
C20:3n3	1.36	0.33	ND	ND	1.28	0.26	1.12	0.25	1.10	0.25
C22:0	1.16	ND	1.00	ND	1.22	ND	1.00	ND	1.00	ND
C22:1n9	ND	ND	1.00	0.25	ND	ND	1.04	ND	0.99	ND
C20:5n3	1.29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C22:2n6	1.50	ND	0.00	ND	ND	ND	1.26	ND	1.24	0.43
C23:0	6.20	0.04	ND	ND	ND	0.06	ND	0.04	ND	0.04
C24:0	1.19	0.07	ND	0.08	1.22	0.08	ND	0.06	ND	0.08
C24:1n9	1.43	0.34	1.30	0.55	1.42	0.45	1.28	0.44	1.20	0.41
C22:6n3	ND	0.91	1.02	ND	ND	0.91	1.12	0.94	1.26	0.90

BS: biomasa seca

T.: transesterificación

ND: No detectado

Se presenta la media de tres experimentos independientes. La desviación estándar se encuentra entre 0.00 y 5.71.

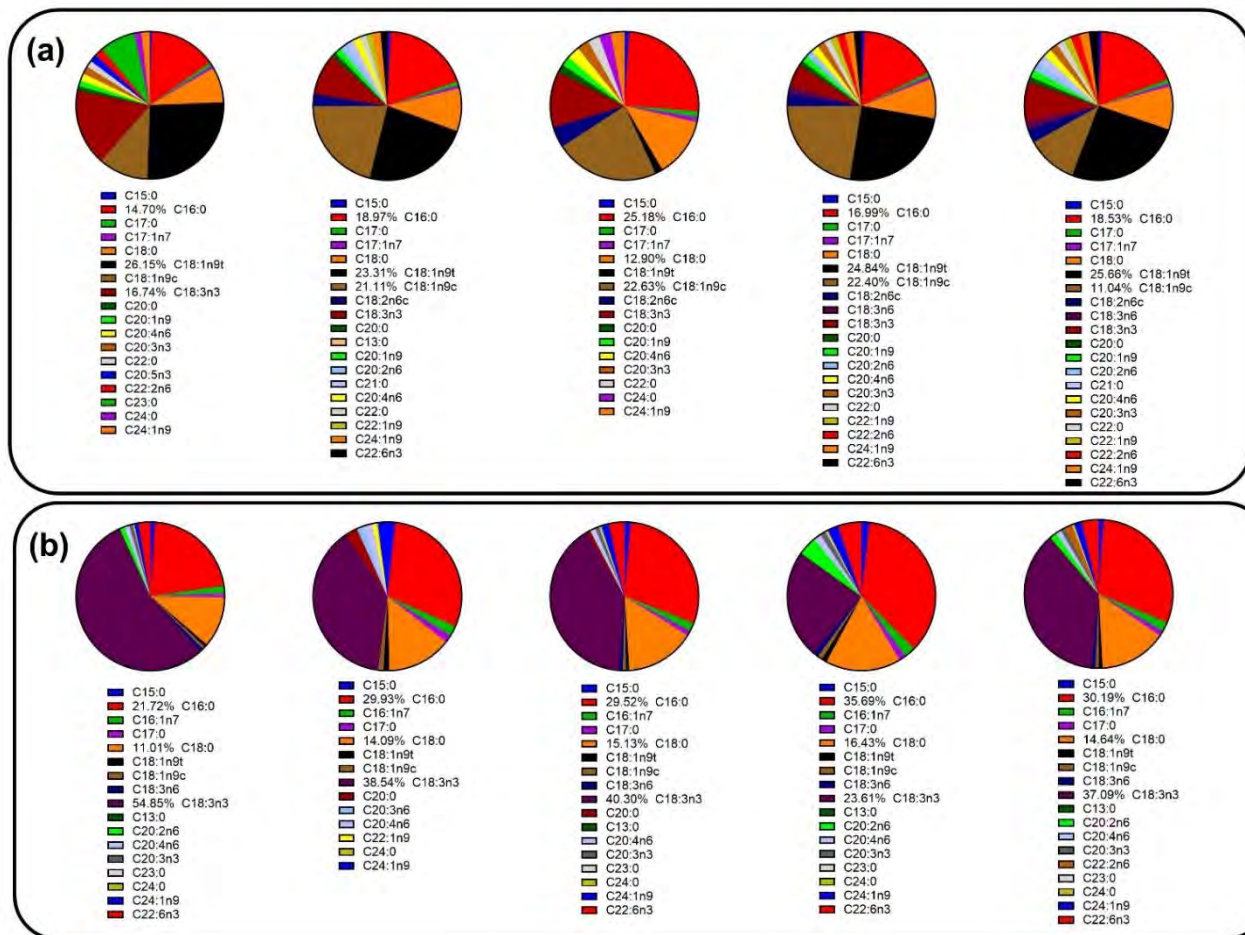


Figura 25. Distribución porcentual de los FAMES componentes del biodiésel de *C. vulgaris* obtenido por: (a) transesterificación in situ, y, (b) transesterificación ex situ. De izquierda a derecha en: medio optimizado, nitrógeno deficiente, nitrógeno limitante, salinidad baja y, salinidad alta.

Para *N. oleoabundans*, la composición del biodiésel se observa variada (figura 26); en la transesterificación *in situ*, los componentes mayoritarios comprenden ácidos grasos desde 18 hasta 24 carbonos, mientras que para la transesterificación *ex situ*, comprenden de 16 a 18 carbonos (cuadro 22).

En el biodiésel obtenido por transesterificación *in situ*, el ácido nervónico (C24:1n9) está presente en todos los tratamientos, y para el cultivo con nitrógeno deficiente, salinidad baja y salinidad alta, se muestra con el mayor porcentaje, entre el 19 y el 28 %, con un rendimiento máximo de 73.97 mg/g en el tratamiento con salinidad baja.

Por otra parte, en la transesterificación *ex situ*, el componente mayoritario es el ácido elaídico (C18:1n9t) con porcentajes entre el 20 y 30 %, excepto para el tratamiento con nitrógeno limitante que tiene como componente mayoritario al ácido palmítico con 26 %. Cabe mencionar que este último se encuentra dentro de los tres componentes mayoritarios en todos los tratamientos por transesterificación *ex situ*.

Cuadro 22. Identificación y cuantificación de FAMES de *N.oleoabundans* bajo condiciones de estrés.

FAMES	FAMES (mg/gBS)									
	Medio optimizado		Nitrógeno deficiente		Nitrógeno limitante		Salinidad baja		Salinidad alta	
	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>
C15:0	ND	0.51	ND	0.47	ND	0.34	ND	0.54	0.89	ND
C16:0	1.58	13.89	2.39	11.74	2.50	12.23	3.53	11.73	ND	24.28
C17:0	ND	0.68	ND	0.52	ND	0.59	ND	0.54	ND	1.08
C17:1n7	ND	0.61	10.70	0.43	22.64	0.52	23.56	0.46	17.48	0.92
C18:0	ND	7.35	ND	5.80	ND	6.30	ND	5.94	ND	12.23
C18:1n9t	ND	27.09	ND	11.64	ND	0.69	ND	18.77	ND	38.06
C18:1n9c	ND	9.44	ND	11.32	18.55	9.74	ND	15.39	ND	12.02
C18:2n6t	56.37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18:2n6c	ND	ND	ND	1.72	ND	2.16	ND	1.84	ND	ND
C18:3n6	ND	ND	27.79	ND	ND	ND	ND	1.14	ND	ND
C18:3n3	ND	15.84	ND	5.50	ND	6.15	55.71	3.29	ND	10.81
C20:0	ND	0.97	ND	0.66	ND	0.87	ND	0.75	ND	1.50
C20:1n9	ND	1.16	16.89	0.84	34.71	0.97	ND	0.97	ND	2.10

C20:2n6	ND	ND	ND	0.96	48.44	1.21	ND	1.09	ND	2.35
C20:3n6	51.14	ND	ND	ND	60.27	ND	ND	ND	ND	ND
C20:4n6	36.17	1.48	27.19	0.99	52.54	1.35	64.35	1.12	44.79	2.28
C20:3n3	ND	1.60	26.61	ND	53.01	1.30	ND	1.14	ND	2.31
C21:0	ND	ND	ND	1.11	ND	ND	ND	ND	ND	2.50
C22:0	ND	1.36	ND	0.92	ND	1.05	ND	1.03	ND	2.09
C22:1n9	32.41	ND	ND	0.94	50.13	ND	60.06	1.06	42.03	2.07
C20:5n3	ND	1.52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C22:2n6	ND	ND	29.45	1.13	ND	ND	ND	1.30	ND	2.62
C23:0	ND	7.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C24:0	ND	1.40	ND	ND	ND	1.05	ND	ND	ND	ND
C24:1n9	40.70	1.67	29.21	1.11	61.87	1.42	73.97	1.31	52.87	2.51
C22:6n3	ND	ND	39.79	0.90	69.73	ND	43.18	1.06	32.99	2.67

BS: biomasa seca

T.: transesterificación

ND: No detectado

Se presenta la media de tres experimentos independientes. La desviación estándar se encuentra entre 0.12 y 23.08.

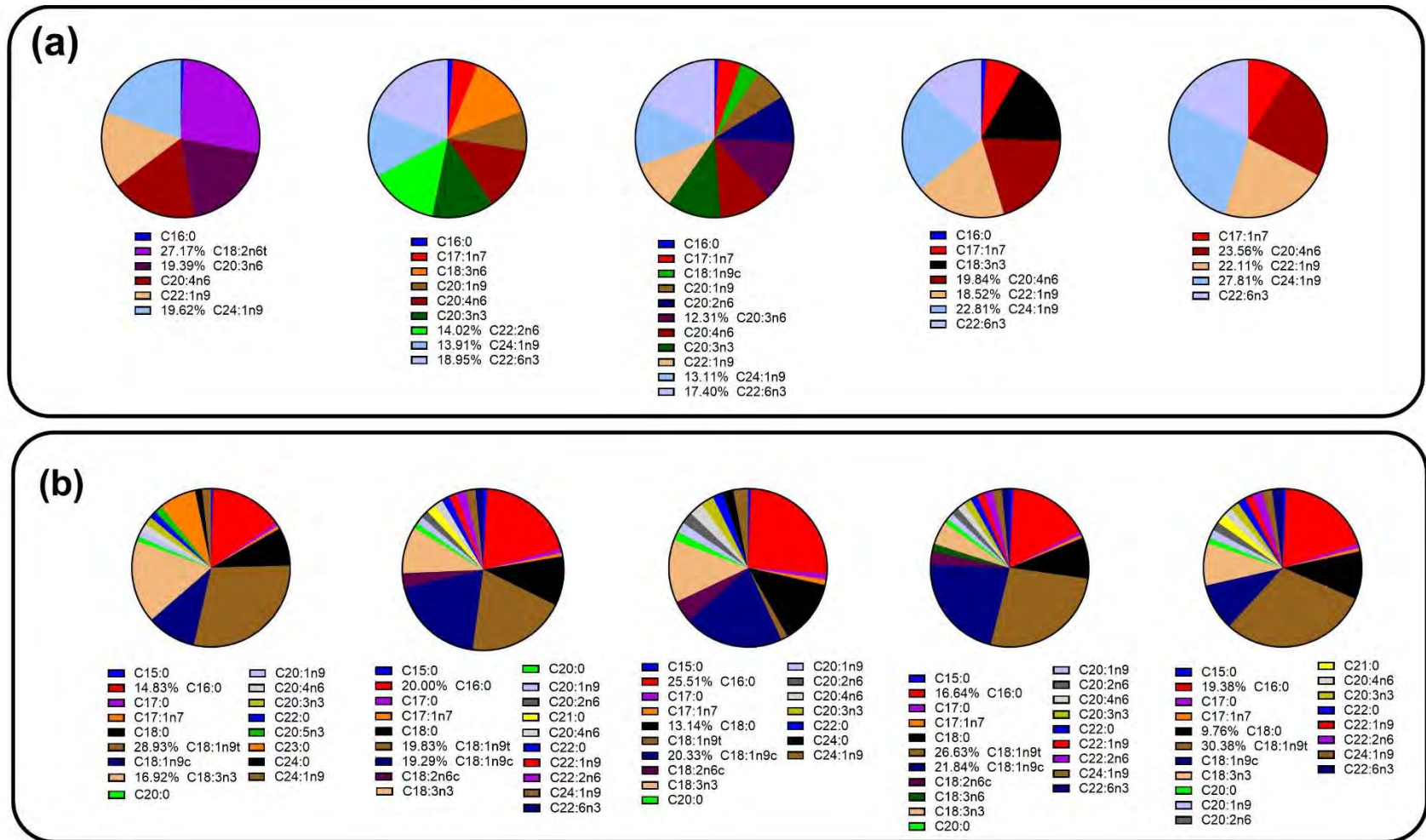


Figura 26. Distribución porcentual de los FAMEs componentes del biodiésel de *N. oleoabundans* obtenido por: (a) transesterificación *in situ*, y, (b) transesterificación *ex situ*. De izquierda a derecha en: medio optimizado, nitrógeno deficiente, nitrógeno limitante, salinidad baja y, salinidad alta.

Para *N. muscorum*, en todos los tratamientos se observan presentes el ácido palmítico (C16:0) y el ácido palmitoleico (C16:1n7). El primero se encuentra en mayor porcentaje en el biodiésel obtenido por transesterificación *in situ*, oscilando entre el 30 y 36 %, mientras que el segundo es el componente mayoritario en todos los tratamientos por transesterificación *ex situ*, excepto en el de nitrógeno deficiente, encontrándose entre 20 y 30 % (figura 27).

En el tratamiento de nitrógeno deficiente, el componente principal es el ácido palmítico, y los otros dos componentes principales son el ácido esteárico y el palmitoleico, independientemente del proceso de transesterificación por el cual se obtuvo el biodiésel.

En el biodiésel por transesterificación *in situ*, se observa, además, la presencia de ácido elaídico (C18:1n9t) entre el 19 y el 21 %, mientras que por transesterificación *ex situ*, se obtuvo ácido oléico (C18:1n9c), en porcentajes de entre 13 y 14 %.

Las cantidades en relación a la biomasa de *N. muscorum* se pueden consultar en el cuadro 23.

Cuadro 23. Identificación y cuantificación de FAMES de *N. muscorum* bajo condiciones de estrés.

FAMES	FAMES (mg/g _{BS})									
	Medio optimizado		Nitrógeno deficiente		Nitrógeno limitante		Salinidad baja		Salinidad alta	
	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>	T. <i>in situ</i>	T. <i>ex situ</i>
C12:0	ND	ND	0.77	ND	0.79	ND	ND	ND	ND	ND
C14:0	1.36	ND	0.97	ND	1.02	ND	1.51	ND	1.07	ND
C15:0	ND	0.16	ND	0.21	ND	0.23	ND	0.51	ND	0.24
C16:0	10.53	2.44	13.10	5.37	6.63	2.68	8.88	3.68	9.36	1.90
C16:1n7	3.96	2.93	4.22	5.06	3.25	4.02	3.54	4.12	4.12	2.13
C17:0	ND	0.21	ND	0.29	ND	0.30	ND	0.57	ND	0.30
C18:0	3.68	1.13	5.90	4.68	2.19	1.12	3.47	1.72	2.94	0.89
C18:1n9t	5.69	ND	3.88	ND	4.26	0.24	5.26	0.46	5.69	0.25
C18:1n9c	ND	1.45	ND	2.10	ND	1.91	ND	2.44	ND	1.41
C18:2n6c	ND	ND	0.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18:2n6t	3.23	ND	3.42	ND	2.55	ND	2.73	ND	3.04	ND
C18:3n3	1.76	1.00	1.42	2.03	1.31	1.17	1.76	1.00	1.44	0.71
C18:3n6	ND	ND	ND	0.29	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C20:0	ND	ND	0.78	0.40	ND	ND	ND	ND	ND	0.24
C20:3n6	ND	ND	ND	ND	ND	0.59	ND	1.09	ND	0.90
C20:4n6	ND	0.29	ND	0.38	ND	0.44	ND	0.86	ND	0.45

C20:3n3	ND	0.26	ND	0.34	ND	0.38	ND	0.75	ND	0.39
C22:1n9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.24
C24:1n9	ND	0.32	ND	0.56	ND	0.46	ND	1.06	ND	0.44
C22:6n3	ND	ND	1.40	0.41	ND	ND	ND	ND	ND	ND

BS: biomasa seca

T.: transesterificación

ND: No detectado

Se presenta la media de tres experimentos independientes. La desviación estándar se encuentra entre 0.00 y 3.71.



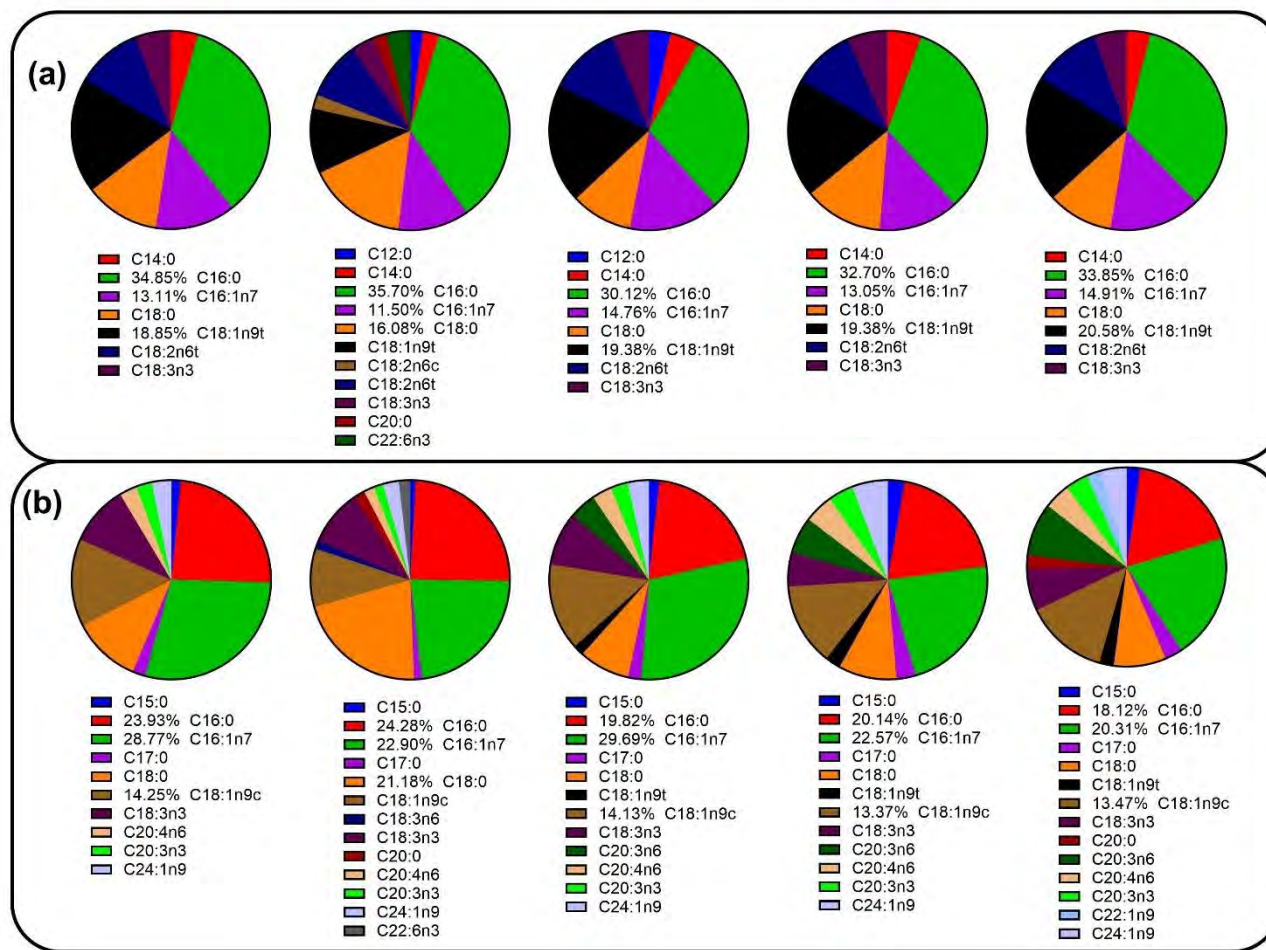


Figura 27. Distribución porcentual de los FAMES componentes del biodiésel de *N. muscorum* obtenido por: (a) transesterificación *in situ*, y, (b) transesterificación *ex situ*. De izquierda a derecha en: medio optimizado, nitrógeno deficiente, nitrógeno limitante, salinidad baja y, salinidad alta.

6.11. Estimación de las propiedades del biodiésel

Se estimaron las propiedades del biodiésel obtenido por transesterificación *in situ* y también por transesterificación *ex situ* (cuadros 24 a 29).

Cuadro 24. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación *in situ* a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la microalga *C. vulgaris*.

Propiedad	Unidades	Límites ^a		Medio optimizado	Nitrógeno deficiente	Nitrógeno limitante	Salinidad baja	Salinidad Alta
		Mín	Máx					
CN	Cetanos	51		51.45 ± 1.15	53.67 ± 1.81	64.00 ± 16.21	52.57 ± 2.14	51.89 ± 1.68
SV	mg KOH/g	---		194.71 ± 2.70	198.37 ± 0.55	199.21 ± 1.90	197.54 ± 1.98	197.26 ± 0.83
IV	g I ₂ /100 g _{aceite}		120	101.48 ± 3.41	89.30 ± 8.37	86.61 ± 6.35	94.71 ± 10.67	97.90 ± 7.82
DU	% en peso			83.04 ± 4.38	83.81 ± 7.23	78.99 ± 4.92	88.13 ± 4.59	87.19 ± 5.04
OS	h	8		8.68 ± 0.39	12.60 ± 2.00	10.28 ± 0.96	14.24 ± 2.18	11.24 ± 2.16
KV	mm ² /s	3.5	5.0	4.21 ± 0.18	4.08 ± 0.04	4.08 ± 0.10	4.07 ± 0.03	4.07 ± 0.04
ρ	g/cm ³	0.86	0.90	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.01	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00
HHV	MJ/kg	35		39.71 ± 0.09	39.62 ± 0.01	39.60 ± 0.06	39.63 ± 0.04	39.63 ± 0.02

CP	°C			15.05 ± 2.49	10.78 ± 3.25	14.62 ± 1.92	9.24 ± 1.10	12.32 ± 0.89
CFPP	°C			26.97 ± 4.19	15.31 ± 4.51	32.98 ± 16.48	16.18 ± 4.47	18.93 ± 1.55
PP	°C	-15	6	9.51 ± 2.71	4.87 ± 3.52	9.04 ± 2.08	3.19 ± 1.19	6.54 ± 0.97
FP	°C	130		169.35 ± 5.94	165.21 ± 1.38	164.98 ± 3.42	164.88 ± 1.03	164.62 ± 1.45

CN: Índice de cetano

ρ: Densidad, 20 °C

SV: Índice de saponificación

HHV: Poder calorífico superior

IV: Índice de yodo

CP: Punto de niebla

DU: Grado de insaturación

CFPP: Punto de obstrucción de filtros en frío

OS: Estabilidad oxidativa, 110 °C

PP: Punto de fluidez

KV: Viscosidad cinemática, 40 °C

FP: Punto de inflamabilidad

^a Estándares EN14214. Tomado de Beyene *et al.*, 2022; Folayan *et al.*, 2019

Cuadro 25. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación *ex situ* a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la microalga *C. vulgaris*.

Propiedad	Unidades	Límites ^a		Medio optimizado	Nitrógeno deficiente	Nitrógeno limitante	Salinidad baja	Salinidad alta
		Mín.	Máx.					
CN	Cetanos	51		33.77 ± 0.41	45.58 ± 1.24	41.94 ± 4.41	48.07 ± 3.25	42.65 ± 3.36
SV	mg KOH/g	---		203.17 ± 0.25	204.03 ± 0.74	203.81 ± 0.58	203.56 ± 1.18	203.12 ± 0.37
IV	g I ₂ /100 g _{aceite}		120	174.88 ± 1.71	121.89 ± 5.92	138.19 ± 19.94	111.07 ± 14.95	135.45 ± 15.07
DU	% en peso			126.23 ± 1.66	91.39 ± 4.14	97.78 ± 13.88	78.57 ± 12.48	98.44 ± 9.14
OS	h	8		4.71 ± 0.08	5.69 ± 0.25	5.53 ± 0.51	7.75 ± 1.48	5.79 ± 0.50
KV	mm ² /s	3.5	5.0	3.25 ± 0.02	3.59 ± 0.01	3.47 ± 0.12	3.66 ± 0.07	3.52 ± 0.10
ρ	g/cm ³	0.86	0.90	0.89 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00
HHV	MJ/kg	35		39.27 ± 0.01	39.37 ± 0.01	39.33 ± 0.03	39.40 ± 0.02	39.36 ± 0.03
CP	°C			10.82 ± 0.36	19.70 ± 1.06	18.66 ± 3.82	23.56 ± 3.69	18.35 ± 2.41
CFPP	°C			8.77 ± 0.55	25.00 ± 4.23	20.91 ± 5.28	23.46 ± 4.93	18.21 ± 2.76
PP	°C	-15	6	4.91 ± 0.39	14.56 ± 1.15	13.43 ± 4.15	18.76 ± 4.01	13.09 ± 2.62
FP	°C	130		138.07 ± 0.58	148.96 ± 0.32	145.15 ± 3.76	151.35 ± 2.33	146.61 ± 3.16

CN: Índice de cetano

ρ : Densidad, 20 °C

SV: Índice de saponificación

HHV: Poder calorífico superior

IV: Índice de yodo

CP: Punto de niebla

DU: Grado de insaturación

CFPP: Punto de obstrucción de filtros en frío

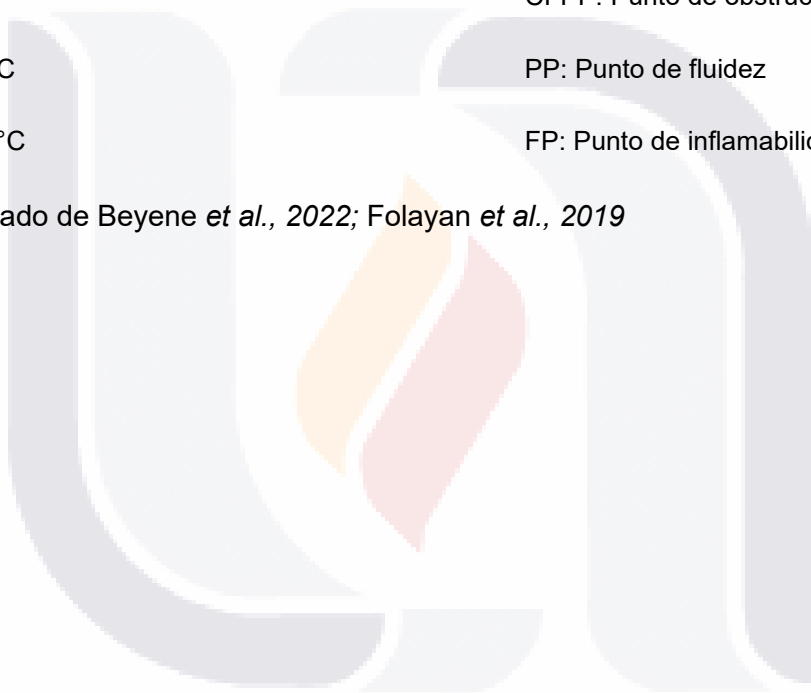
OS: Estabilidad oxidativa, 110 °C

PP: Punto de fluidez

KV: Viscosidad cinemática, 40 °C

FP: Punto de inflamabilidad

^a Estándares EN14214. Tomado de Beyene *et al.*, 2022; Folayan *et al.*, 2019



CN: Índice de cetano

ρ : Densidad, 20 °C

SV: Índice de saponificación

HHV: Poder calorífico superior

IV: Índice de yodo

CP: Punto de niebla

DU: Grado de insaturación

CFPP: Punto de obstrucción de filtros en frío

OS: Estabilidad oxidativa, 110 °C

PP: Punto de fluidez

KV: Viscosidad cinemática, 40 °C

FP: Punto de inflamabilidad

^aEstándares EN14214. Tomado de Beyene *et al.*, 2022; Folayan *et al.*, 2019.



CN: Índice de cetano

ρ : Densidad, 20 °C

SV: Índice de saponificación

HHV: Poder calorífico superior

IV: Índice de yodo

CP: Punto de niebla

DU: Grado de insaturación

CFPP: Punto de obstrucción de filtros en frío

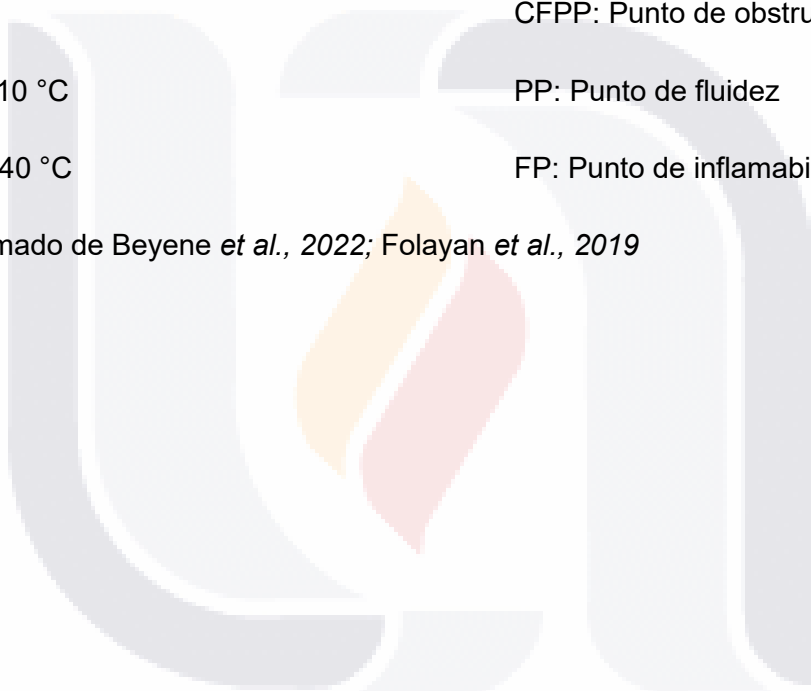
OS: Estabilidad oxidativa, 110 °C

PP: Punto de fluidez

KV: Viscosidad cinemática, 40 °C

FP: Punto de inflamabilidad

^aEstándares EN14214. Tomado de Beyene *et al.*, 2022; Folayan *et al.*, 2019



CN: Índice de cetano

ρ : Densidad, 20 °C

SV: Índice de saponificación

HHV: Poder calorífico superior

IV: Índice de yodo

CP: Punto de niebla

DU: Grado de insaturación

CFPP: Punto de obstrucción de filtros en frío

OS: Estabilidad oxidativa, 110 °C

PP: Punto de fluidez

KV: Viscosidad cinemática, 40 °C

FP: Punto de inflamabilidad

^aEstándares EN14214. Tomado de Beyene *et al.*, 2022; Folayan *et al.*, 2019



Cuadro 29. Propiedades del biodiésel producido por transesterificación *ex situ* a partir del cultivo optimizado y en condiciones de estrés de la cianobacteria *N. muscorum*.

Propiedad	Unidades	Límites ^a		Medio optimizado	Nitrógeno deficiente	Nitrógeno limitante	Salinidad baja	Salinidad alta
		Mín.	Máx.					
CN	Cetanos	51		52.41 ± 2.27	54.31 ± 6.50	52.33 ± 1.33	53.65 ± 0.88	50.34 ± 1.44
SV	mg KOH/g	----		208.76 ± 1.51	208.94 ± 1.82	206.80 ± 1.44	204.52 ± 0.76	203.10 ± 2.62
IV	g I ₂ /100 g _{aceite}		120	88.83 ± 10.79	80.28 ± 28.34	90.30 ± 5.17	85.72 ± 3.61	101.26 ± 7.85
DU	% en peso			78.54 ± 8.58	63.67 ± 22.36	87.89 ± 2.30	86.04 ± 5.00	88.55 ± 5.37
OS	h	8		14.74 ± 1.21	13.85 ± 4.40	17.48 ± 2.77	25.10 ± 7.69	20.35 ± 4.91
KV	mm ² /s	3.5	5.0	3.63 ± 0.04	3.68 ± 0.25	3.70 ± 0.10	3.83 ± 0.06	3.78 ± 0.06
ρ	g/cm ³	0.86	0.90	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.88 ± 0.00
HHV	MJ/kg	35		39.30 ± 0.03	39.31 ± 0.11	39.35 ± 0.06	39.43 ± 0.03	39.44 ± 0.06
CP	°C			12.17 ± 3.27	21.69 ± 9.04	7.85 ± 2.23	10.50 ± 2.78	10.35 ± 0.74
CFPP	°C			10.67 ± 4.55	32.30 ± 3.56	1.44 ± 2.81	6.50 ± 0.96	4.47 ± 1.66
PP	°C	-15	6	8.21 ± 2.23	22.34 ± 1.95	1.68 ± 2.43	6.31 ± 0.03	4.39 ± 0.81
FP	°C	130		150.25 ± 1.29	151.94 ± 8.07	152.59 ± 3.12	156.93 ± 1.83	155.20 ± 1.94

CN: Índice de cetano

ρ : Densidad, 20 °C

SV: Índice de saponificación

HHV: Poder calorífico superior

IV: Índice de yodo

CP: Punto de niebla

DU: Grado de insaturación

CFPP: Punto de obstrucción de filtros en frío

OS: Estabilidad oxidativa, 110 °C

PP: Punto de fluidez

KV: Viscosidad cinemática, 40 °C

FP: Punto de inflamabilidad

^aEstándares EN14214. Tomado de Beyene *et al.*, 2022; Folayan *et al.*, 2019.



7. DISCUSIÓN

El contenido de lípidos en las microalgas y cianobacterias varía dependiendo de la especie y el ambiente en el que crezcan, para *C. vulgaris* comprende del 5 al 58 %, mientras que para *N. oleabundans* se reporta que puede alcanzar hasta 55 % (Markou *et al.*, 2014; Ru *et al.*, 2020; Safi *et al.*, 2021). En las condiciones autotróficas que se probaron, el contenido alcanzó como máximo 21 % para *C. vulgaris*, que cae dentro del rango mencionado, sin embargo, para *N. oleabundans* se obtuvo un mayor porcentaje, llegando a 77 %.

Sun *et al.* (2014) cultivaron *C. vulgaris* agregando glicerol o glucosa; el glicerol fue añadido en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 30 g/L, observando que el crecimiento de *C. vulgaris* se inhibió a la concentración de 15 g/L, y el rendimiento de lípidos se afectó negativamente cuando el glicerol excedió los 10 g/L. En ese estudio, se utilizaron diferentes modos de cultivo; los resultados correspondientes al modo batch tuvieron como producción de biomasa 1.32 g/L. En otro estudio, la concentración de biomasa de *C. vulgaris* alcanzó 1.72 g/L y 15.91 % lípidos cuando se adicionó con 5 g/L de glicerol al medio de cultivo (Choi y Yu, 2015).

Estos resultados son similares a los logrados en este proyecto, sin embargo, en producción de lípidos Sun *et al.* lograron 355 mg/L, que representa un contenido de más del doble al obtenido en el medio optimizado, sugiriendo que la adición de glicerol favorece la producción de lípidos. Cabe mencionar que Pacheco *et al.* (2017) mencionan que las altas concentraciones de glicerol en cultivos mixotróficos tienden a cambiar los tilacoides en los cloroplastos, favoreciendo la asimilación de glicerol como respuesta adaptativa al estrés impuesto por las condiciones mixotróficas, sin embargo, el efecto positivo está limitado a una concentración dada, después de la cual se observan efectos inhibitorios en el crecimiento de la biomasa y la producción de lípidos. Por esta razón, encontrar la cantidad exacta de glicerol para cada especie de estudio fue un paso fundamental en la primera fase del

proyecto, y la metodología de superficie de respuesta fue utilizada para encontrar las condiciones óptimas de cultivo mixotrófico.

Silva *et al.* (2016) cultivaron la misma cepa de *N. oleoabundans* que la del presente proyecto, en cultivo mixotrófico de glucosa y acetato de sodio, en el que se observó un efecto sinérgico de estos compuestos obteniendo resultados de biomasa de 1.75 g/L y 34.4 % de lípidos. Contrariamente, en nuestros resultados se observa claramente un efecto antagonista del acetato en cuanto a la concentración de biomasa, sin embargo, el porcentaje de lípidos fue de más del doble que el de ese estudio.

N. muscorum ha sido estudiada para fines de remediación, para la obtención de bioplásticos y para la producción de biodiésel por lo que ha sido cultivada en diferentes tipos de medio de cultivo con rendimientos en biomasa variados. Mostafa *et al.* (2012) obtuvieron 181.12 mg/L después de 15 días cultivada en medio BG-11, mientras que El Shafay *et al.* (2021) la cultivaron en medio Allen por 24 días obteniendo una biomasa máxima de 640 mg/L. *Nostoc* sp. cultivada en agua residual al 75% por 10 días obtuvo una concentración de biomasa de 1310 mg/L (Silambarasan *et al.*, 2021). Nuestro resultado en medio optimizado, después de 10 días es de 589 mg/L. Con respecto a los lípidos, los reportes son también variados, con productividades para *N. muscorum* de 1.99 mg/L/d (Kamilya *et al.* 2006), 3.03 mg/L/d (Patel *et al.*, 2018) y 6.08 mg/L/d (El Shafay *et al.*, 2021), mientras que para *Nostoc* sp. obtuvieron 19.46 mg/L/d (Silambarasan *et al.*, 2021). Nuestro resultado en medio optimizado fue de 4.9 mg/L/d; tanto la biomasa como los lípidos se encuentran en un punto intermedio a los obtenidos por dichos autores.

Los lípidos de microalgas han demostrado C14: 0, C16: 0, C18: 1, C18: 2 y C18: 3 como principales ácidos grasos, y se consideran adecuados para la producción de biodiésel de calidad (Mary Leema *et al.*, 2021). Sin embargo, las condiciones de cultivo y adición de nutrientes han mostrado tener influencia sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos algales (Guldhe *et al.*, 2017), tal como se observó

en el presente proyecto, en donde la variación de la composición del medio optimizado, condujo a variaciones en la distribución de los ácidos grasos componentes del biodiésel, sin embargo, la mayoría se encuentra entre C16 a C18, lo cual como se mencionó anteriormente es adecuado para la producción de biodiésel.

Sun *et al.* (2014), encontraron que la composición de ácidos grasos de *C. vulgaris* cambió dependiendo del sustrato adicionado, pero en general, el ácido graso C16:0 representó del 28.79 al 30.31% de la composición total de ácidos grasos, y el C18:1, del 17.68 al 31.74%, siendo estos dos los ácidos grasos que representan la mayor proporción de la composición total. Estos resultados concuerdan con la composición de *C. vulgaris* cultivada en el medio optimizado.

Para *C. vulgaris*, los principales ácidos grasos saturados son C16:0 y C18:0, pero también se tienen ácidos grasos insaturados como el C18:1n9t y el C18:3n3. Estos resultados son similares a los mencionados por Rautenberger *et al.* (2024), para *C. vulgaris* cultivada en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas; estas últimas adicionando 5 g/L de glucosa. Por otra parte, Kumaran *et al.* (2023) reportaron aproximadamente la misma composición cultivándola en medio BG11 por 22 días. La composición del biodiésel obtenido de *C. vulgaris*, también es similar a la obtenida de aceites vegetales de linaza, palma y soya (Sánchez-Borroto *et al.*, 2012).

El Shafay *et al.* (2021) estudiaron el perfil de ácidos grasos de la cianobacteria *Anabaena variabilis* encontrando la presencia de los ácidos palmítico (15 – 30.8 %), linoleico (18.1 -33.5 %) y oléico (5.58 -45.04 %) entre los más abundantes, pero también estuvieron presentes ácido palmitoleico (C16:1) y ácido estéarico (C18:0). Esta composición es muy similar a la cianobacteria de nuestro estudio, cuando se cultivó en medio optimizado y aplicando condiciones de estrés.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las propiedades del biodiésel fueron estimadas a partir del perfil de ácidos grasos obtenido de los tratamientos, y comparadas con los parámetros internacionales de calidad para el biodiésel EN14214. Esto es posible debido a que la composición del biodiésel depende de las propiedades de sus ácidos grasos de manera individual (Sánchez-Borroto et al., 2012).

El número de cetano (CN) es una de las propiedades más importantes de un combustible e indica las características de ignición; un CN muy bajo reduce el rendimiento térmico lo que provoca golpeteo, combustión incompleta y aumento de la emisión de gases; por el contrario, un mayor CN reduce la emisión de gases lo que implica reducción de la contaminación (Simbi et al., 2022). El CN aumenta con la longitud de las cadenas de carbono y la disminución en el número de insaturaciones (Sánchez-Borroto et al., 2012), esto puede explicar que para el biodiésel obtenido por transesterificación *in situ* de *N. oleoabundans* no se cumpliera con el valor mínimo de 51 que proponen los estándares de calidad, ya que en estos tratamientos, se presentan ácidos grasos más ramificados, por ejemplo, el ácido 8,11,14-cis eicosatrienoico (C20:3n6) y el ácido araquidónico (C20:4n6), en porcentajes de hasta 19 y 24 %, respectivamente. El biodiésel obtenido por transesterificación *ex situ* de la biomasa de *C. vulgaris* presenta en su composición ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0), los cuales no son ramificados, sin embargo, también presenta ácido α -linolénico (C18:3n3) en proporciones importantes de hasta 55 %, lo cual pudo influir para que tampoco alcanzara el límite mínimo de CN. Todos los demás tratamientos, cumplen con el estándar de calidad.

La reacción de saponificación es una reacción intermedia durante la transesterificación en la producción de biodiésel; un índice de saponificación (SV) más bajo, representa una mejor calidad de biodiésel (Cardoso et al., 2020). Los valores de SV obtenidos para todas las especies de este proyecto se encuentran aproximadamente en 200 mg_{KOH}/g. Si bien no existe un valor límite en los estándares de calidad, este resultado se aproxima a los valores obtenidos en la

producción de biodiésel de aceites de palma (196-202), de soya (189-195) y girasol (188-194) (Cardoso et al., 2020).

La estabilidad oxidativa (OS) se refiere a la resistencia relativa a los cambios físicos y químicos producidos por la interacción con el ambiente (luz, calor, aire, entre otros) durante el almacenamiento prolongado del biodiésel; el tamaño de la cadena de los ácidos grasos, así como la presencia de insaturación afectan directamente a la OS (Moreira-Santos, 2012). El lineamiento mínimo para esta propiedad es de 8 h, y se puede observar que excepto para el biodiésel obtenido de *C. vulgaris* por transesterificación *ex situ* (cuadro 25) en todos los tratamientos se cumple esta propiedad.

El índice de yodo (IV) es la masa de yodo absorbida en 100 g de biodiésel a través de la reacción entre el I₂ y los dobles enlaces carbono-carbono, proporcionando una medida del grado de insaturación (Díez Valbuena et al., 2024). El IV tiene como límite máximo 120 g_{I2}/100 g; nuevamente se observa que el biodiésel de *C. vulgaris* por transesterificación *ex situ*, así como el de *N. oleoabundans* por transesterificación *in situ* (cuadros 25 y 26), no cumplen con este parámetro debido a que en su composición presentan una gran proporción de ácidos grasos con insaturaciones. Asimismo, para *N. oleoabundans* el índice de yodo y el número de cetano para la transesterificación *in situ*, no cumplen con el límite establecido. Estos resultados son similares a los obtenidos por Altunoz et al. (2021), quienes cultivaron *N. oleoabundans* en medio BG-11 adicionado con diferentes cantidades de residuos de lodo, y al determinar las propiedades del biodiésel obtuvieron valores de CN ≤ 50, y valores de IV entre 107 y 136 g_{I2}/100 g.

El punto de nube o punto de niebla (CP) es la temperatura a la cual se hacen visibles los cristales que se forman cuando el combustible se enfría gradualmente; el punto de fluidez (PP) es la temperatura a la cual el crecimiento y posterior aglomeración de los cristales impiden el libre flujo del combustible (Benjumea et al., 2007). El PP fue el único parámetro en el que se presentaron mayores diferencias

entre los tratamientos al interior de cada especie estudiada, y se observa en el cuadro 22 y el cuadro 25, que solamente en los tratamientos con deficiencia de nitrógeno y salinidad baja, tanto para *C. vulgaris* como para *N. oleabundans* se cumplen los límites establecidos para la calidad del biodiésel, con temperaturas entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los componentes mayoritarios en estos tratamientos son los mismos, teniendo al ácido palmítico (C16:0), al ácido elaídico (C18:1n9t) y el ácido oleico (C18:129c), lo que sugiere que esta mezcla de ácido graso saturado con ácidos grasos monoinsaturados, favorece el PP, lo cual corresponde a lo que menciona El-Sheekh et al. (2019), debe existir un balance óptimo entre los ácidos grasos saturados e insaturados para lograr una alta calidad en el biodiésel. Por otra parte, Benjumea et al. (2007) y Jing et al. (2019) mencionan que aun los diferentes tipos de biodiésel que se comercializan (provenientes de aceites de colza, soya y girasol) presentan un desempeño pobre a bajas temperaturas comparado con el diésel convencional, por lo cual se han implementado algunas estrategias como el mezclado del biodiésel con el diésel, el uso de aditivos o el fraccionamiento mediante una cristalización inducida y posterior separación de las fracciones sólida y líquida formadas.

Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes para establecer el potencial de incendio y explosión de un material peligroso como lo es un combustible, es su punto de inflamación (FP). El FP se define como la temperatura más baja, corregida a una presión de 1 atm, a la que un líquido libera vapor que puede formar una mezcla combustible con aire (Costa do Nascimento et al., 2021). El biodiésel obtenido de todas las especies se encuentra en el límite establecido en la EN 14214 para el FP que es de mínimo $101\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que el FP estimado más bajo estuvo en $138\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el más alto en $176\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para todas las especies, los parámetros de viscosidad, densidad, poder calorífico y punto de inflamabilidad cumplen con los estándares, por lo que se podrían considerar como adecuadas para la producción de biodiésel.

Cabe señalar que *N. muscorum*, en el cultivo mixotrófico en la primera fase del proyecto, presentó alto contenido de ácido linoleico (C18:2n:6c) y el α -linolénico (C18:3n3) que tienen importancia debido a que son ácidos grasos esenciales, es decir, no se pueden sintetizar *de novo* por lo que deben ser suministrados a través de la dieta (Dorni *et al.*, 2018; Levasseur *et al.*, 2020). De manera semejante, *N. oleoabundans* en el cultivo mixotrófico en condiciones de nitrógeno deficiente y nitrógeno limitante, muestran porcentajes de 14 y 17 %, respectivamente, de ácido cis 4,7,10,13,16,19 docosahexanoico, comúnmente conocido como DHA (C22:6n3), reconocido por tener múltiples beneficios en la salud cardiovascular, anti-inflamatoria y salud neurológica (Jesionowska *et al.*, 2023), por lo que el cultivo mixotrófico de estas especies podría tener aplicaciones nutraceuticas también.

8. CONCLUSIONES

C. vulgaris, *N. oleoabundans* y *N. muscorum* mostraron capacidad de cultivarse mixotróficamente con acetato de sodio y glicerol, sin embargo, fue necesario diseñar un medio de cultivo optimizado y específico para cada una de las especies. Asimismo, contienen una variedad de ácidos grasos que pueden ser utilizados para producir biodiésel.

La composición de los FAMES obtenidos tiene una gran influencia en las propiedades del biodiésel, por lo que el conocimiento de las condiciones en las que se cultivaron en este proyecto y sus resultados, son valiosos para futuras aplicaciones. En las condiciones probadas en este proyecto se concluye que:

- La transesterificación *in situ* resultó en mejores propiedades del biodiésel obtenido de *C. vulgaris* y de *N. muscorum*
- La transesterificación *ex situ* en los tratamientos con nitrógeno deficiente y salinidad baja, para *N. oleoabundans* produjo biodiésel de buena calidad

- La transesterificación *in situ* de los tratamientos con nitrógeno deficiente y nitrógeno limitante en *N. oleoabundans* resultó en contenidos importantes de DHA, que es un compuesto muy valioso por sus aplicaciones en medicina y nutrición humana.
- La transesterificación *in situ* en *N. muscorum* en 10 días del cultivo optimizado resultó también en la producción de ácidos grasos esenciales, que son importantes en nutracéutica.

9. REFERENCIAS

- Abdullah, M., Ali, Z., Yasin, M. T., Amanat, K., et al. (2024). Advancements in sustainable production of biofuel by microalgae: Recent insights and future directions, *Environmental Research*, 262(2), <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119902>.
- Abdullahi, I. K., Ravikumar, R. (2024). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using aquaculture wastewater: Assessing its viability as a promising resource for biodiésel production. *Desalination and Water Treatment* (320) 100797. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100797>.
- Abideen, Z., Hameed, A., Koyro, H.-W., Gul, B., Ansari, R., & Khan, M. A. (2014). Sustainable biofuel production from non-food sources - An overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(12), 1057-1066.
- Adesanya, V. O., Davey, M. P., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2014). Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. [Article]. *Bioresource Technology*, 157, 293-304.
- Altunoz, M., Montevecchi, G., Masino, F., Zanasi, L., Antonelli, A. (2021). Biodiésel properties of *Neochloris oleoabundans* grown in sludge waste. *Cleaner Engineering and Technology* (5) 100295. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100295>.

- Anahas, A. M. P., & Muralitharan, G. (2015). Isolation and screening of heterocystous cyanobacterial strains for biodiésel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Bioresource Technology*, 184(Supplement C), 9-17.
- ANMAT. (2013). *Farmacopea Argentina* (7th ed. Vol. II). Argentina.
- Arguelles, E., Laurena, A. C., Monsalud, R. G., & Martinez-Goss, M. R. (2018). Fatty acid profile and fuel-derived physico-chemical properties of biodiésel obtained from an indigenous green microalga, *Desmodesmus* sp. (I-AU1), as potential source of renewable lipid and high quality biodiésel. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 411-419.
- Barton, R. R. (2013). Response Surface Methodology. In S. I. Gass & M. C. Fu (Eds.), *Encyclopedia of Operations Research and Management Science* (pp. 1307-1313). Boston, MA: Springer US.
- Bassi, A., Saxena, P., & Aguirre, A.-M. (2014). Mixotrophic Algae Cultivation for Energy Production and Other Applications In R. P. Bajpai, Ales Zappi, Mark (Ed.), *Algal Biorefineries* (1 ed., Vol. Volume 1: Cultivation of Cells and Products, pp. 177-202): Springer Netherlands.
- Behera, B. K., & Varma, A. (2019). Diesel-Like Biofuels. In B. K. Behera & A. Varma (Eds.), *Bioenergy for Sustainability and Security* (pp. 159-204). Cham: Springer International Publishing.
- Benjumea, P. N., Agudelo, J. R. & Ríos, L. A. (2007). Propiedades de flujo a baja temperatura del biodiésel de aceite de palma. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* (42) 94-104.
- Bermejo, E., Filali, R., & Taidi, B. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. *CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY*, 41 (4), 457–473. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species.
- Byreddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., & Puri, M. (2016). A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 125, 28-32.

- Cardoso, L.G., Duarte, J.H., Alberto, J., Costa, V., Assis, D.D.J., Lemos, P.V.F., Druzian, J.I., Souza, C.O., Nunes, I.L., Chinalia, F.A. (2020). Spirulina sp. as a bioremediation agent for aquaculture wastewater: Production of high added value compounds and estimation of theoretical biodiesel. *Bioenergy Res.* (14) 254–264. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-020-10153-4>.
- Champenois, J., Marfaing, H., & Pierre, R. (2015). Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1845-1851.
- Choi, H. J., & Yu, S. W. (2015). Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(3), 506–513. <https://10.1080/13102818.2015.1013988>.
- Costa do Nascimento, D., Conti, D. C., Barbosa Neto, A. M., Costa, M. C. (2021). Flash point measurement and prediction of dodecane + ethanol + FAEE systems. *Fuel* (306) 121723. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121723>.
- Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Processing Technology*, 191, 232-247.
- Díez Valbuena, G., García Tuero, A., Díez, J., Rodríguez, E., Hernández Battez, A. (2024). Application of machine learning techniques to predict biodiesel iodine value. *Energy* (292) 130638. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.130638>.
- Dorni, C., Sharma, P., Saikia, G., Longvah, T. (2018). Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India. *Food Chem* (238), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.072>
- Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J.-G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114-122.
- El Shafay, S.M.; Gaber, A.; Alsanie, W.F.; Elshobary, M.E. (2021). Influence of Nutrient Manipulation on Growth and Biochemical Constituent in *Anabaena variabilis* and *Nostoc muscorum* to Enhance Biodiesel Production. *Sustainability* (13) 9081. <https://doi.org/10.3390/su13169081>.
- El-Sheekh, M. M., Gheda, S. F., El-Sayed, A. E.-K. B., Abo Shady, A. M., El-Sheikh, M. E., & Schagerl, M. (2019). Outdoor cultivation of the green microalga

Chlorella vulgaris under stress conditions as a feedstock for biofuel. Environmental Science and Pollution Research. doi:10.1007/s11356-019-05108-y.

Formighieri, C. (2015). Biodiésel from Microalgae. In C. Formighieri (Ed.), *Solar-to-fuel conversion in algae and cyanobacteria* (pp. 19-26). Cham: Springer International Publishing.

Francisco, E. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., & Franco, T. T. (2010). Microalgae as feedstock for biodiésel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(3), 395-403.

Garibay-Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez-Saavedra, M. d. P., Serrano-Carreón, L., & Alfredo, M.-J. (2009). Biodiésel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 13(3), 38 - 61.

Gazzoni, D. L., & Dall'Agnol, A. (2016). Oil Crops in the Context of Global Biodiésel Production. In C. R. Soccol, S. K. Brar, C. Faulds & L. P. Ramos (Eds.), *Green Fuels Technology: Biofuels* (pp. 41-82). Cham: Springer International Publishing.

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A. T., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A., & Dabbagh, F. (2012). Microalgae biofuel potentials (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 126-144.

Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., & Eaton, A. D. (1992). *Standard methods for the examination of water and waste water* (18th ed.). Washington D. C.: U.S. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation.

Grewe, C. B., & Pulz, O. (2012). The Biotechnology of Cyanobacteria. In B. A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (pp. 707-739). Dordrecht: Springer Netherlands.

Guimarães, D. H. P., Aguirre, L. R., Gonçalves, B. C. M., Santos, R. M., Wallyson, R. (2019). Physico-chemical analysis of biodiésel obtained from blends of virgin castor oil and waste frying oil. *Revista de Ciencia y Tecnología* (32) 1-10.

- Guldhe, A., Ramluckan, K., Singh, P., Rawat, I., Mahalingam, S. K., & Bux, F. (2017). Catalytic Conversion of Microalgal Lipids to Biodiésel: Overview and Recent Advances. In S. K. Gupta, A. Malik & F. Bux (Eds.), *Algal Biofuels: Recent Advances and Future Prospects* (pp. 315-329). Cham: Springer International Publishing.
- Hidalgo, P., Toro, C., Ciudad, G., & Navia, R. (2013). Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiésel production. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 12(2), 179-199.
- Ilica, A. *Manual de Biocombustibles*: Arpel.
- Imahara, H., Minami, E., & Saka, S. (2006). Thermodynamic study on cloud point of biodiésel with its fatty acid composition. *Fuel*, 85(12-13), 1666-1670.
- Jesionowska, M., Ovadia, J., Hockemeyer, K., Clews, A. C., Xu, Y. (2023). EPA and DHA in microalgae: Health benefits, biosynthesis, and metabolic engineering advances. *J Am Oil Chem Soc.* 100(11) 831–842. <https://doi.org/10.1002/aocs.12718>.
- Jing, G., Yu, H., Sun, Z. et al. (2019). Research Progress on Biodiésel Pour Point Depressant: a Mini-Review. *Pet. Chem* (59) 1023–1027. <https://doi.org/10.1134/S0965544119090068>.
- Joshi, G., Pandey, J. K., Rana, S., & Rawat, D. S. (2017). Challenges and opportunities for the application of biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(Supplement C), 850-866.
- Kamilya, D., Sarkar, S., Maiti, T. K., Bandyopadhyay, S., Mal, B. C. (2006). Growth and nutrient removal rates of *Spirulina platensis* and *Nostoc muscorum* in fish culture effluent: a laboratory-scale study. *Aquac Res*, 37(15), 1594-1597. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01588.x>
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., et al. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiésel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(6), 862-876.
- Kiran, B., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*, 88, 1228-1244.

- Kobayashi, N., Barnes, A., Jensen, T., Noel, E., Andlay, G., Rosenberg, J. N., et al. (2015). Comparison of biomass and lipid production under ambient carbon dioxide vigorous aeration and 3% carbon dioxide condition among the lead candidate *Chlorella* strains screened by various photobioreactor scales. *Bioresource Technology*, 198, 246-255.
- Krisnangkura, K. (1986). A SIMPLE METHOD FOR ESTIMATION OF CETANE INDEX OF VEGETABLE OIL METHYL-ESTERS. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63(4), 552-553.
- Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 252-255.
- Kumaran, M., Palanisamy, K. M., Bhuyar, P., Maniam, G. P., Ab. Rahim, M. H., Govindan, N. (2023). Agriculture of microalgae *Chlorella vulgaris* for polyunsaturated fatty acids (PUFAs) production employing palm oil mill effluents (POME) for future food, wastewater, and energy. *Nexus* (9) 100169. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100169>.
- Lackner, M. (2017). 3rd-Generation Biofuels: Bacteria and Algae as Sustainable Producers and Converters. In W.-Y. Chen, T. Suzuki & M. Lackner (Eds.), *Handbook of Climate Change Mitigation and Adaptation* (pp. 3173-3210). Cham: Springer International Publishing.
- Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41:107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
- Majhi, B. K. (2024). Cyanobacteria: Photosynthetic cell factories for biofuel production, *Journal of Bioresources and Bioproducts*, <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2024.10.001>.

- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* (65)86-202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>.
- Mary Leema, J. T., Persia Jothy, T., Magesh Peter, D., Kumar, T.S., Dharani, G. (2021). A critical look into different salt removal treatments for the production of high value pigments and fatty acids from marine microalgae *Chlorella vulgaris* (NIOT-74). *Biotechnology Reports* (30) e00627. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00627>.
- Melinda, J. G. (2013). Microalgal Cultivation Reactor Systems *Biotechnological Applications of Microalgae* (pp. 51-76): CRC Press.
- Mostafa, S. S. M., & Mahmoud, G. I. (2012). Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiésel Production. [Article]. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(1), 56-65.
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., et al. (2013). Screening Microalgae Strains for Biodiésel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Research*, 6(1), 1-13.
- Pacheco, M. M., Hoeltz, M., de Souza, D., Benitez, L. B., Schneider, R. C. S., & Müller, M. V. G. (2017). Current Approaches in Producing Oil and Biodiésel from Microalgal Biomass. In L. Singh & V. C. Kalia (Eds.), *Waste Biomass Management – A Holistic Approach* (pp. 289-310). Cham: Springer International Publishing.
- Padrón, A. G., Bailey, A. E., & Cartaya, L. M. (2001). *Aceites y grasas industriales*: Reverté.
- Park, J. Y., Kim, D. K., Lee, J. P., Park, S. C., Kim, Y. J., & Lee, J. S. (2008). Blending effects of biodiésels on oxidation stability and low temperature flow properties. *Bioresource Technology*, 99(5), 1196-1203.

- Patel, A., Arora, N., Mehtani, J., Pruthi, V., & Pruthi, P. A. (2017). Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 77, 604-616.
- Patel, V. K., Sundaram, S., Patel, A. K., Kalra, A. (2018). Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production. *Arab J Sci Eng*, 43(1), 109-121. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2666-0>
- Perez-Garcia, O., & Bashan, Y. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In A. Prokop, R. K. Bajpai & M. E. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design* (pp. 61-131). Cham: Springer International Publishing.
- Pragya, N., Pandey, K. K., & Sahoo, P. K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.
- Příbyl, P., Cepák, V., & Zachleder, V. (2014). Oil Overproduction by Means of Microalgae. In R. Bajpai, A. Prokop & M. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries: Volume 1: Cultivation of Cells and Products* (pp. 241-273). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Rai, M. P., & Gupta, S. (2017). Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*. *Energy Conversion and Management*, 141, 85-92.
- Rajkumar, R., Yaakob, Z., & Takriff, M. S. (2014). Potential of the Micro and Macro Algae for Biofuel Production: A Brief Review. *Bioresources*, 9(1), 1606-1633.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 100(1), 261-268.
- Rastogi, R. P., Pandey, A., Larroche, C., & Madamwar, D. (2017). Algal Green Energy – R&D and technological perspectives for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.

- Rautenberger, R., Détain, A., Skjånes, K., Schulze, P. S. C., Kiron, V., Morales-Sánchez, D. (2024). Growth strategies of *Chlorella vulgaris* in seawater for a high production of biomass and lipids suitable for biodiesel. *Algal Research* (77) 103360. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103360>.
- REN21. 2024. Renewables 2024 Global Status. Report Collection, Global Overview (pp. 16(Paris: REN21 Secretariat).
- Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture : Applied Phycology and Biotechnology* (2). Somerset, GB: Wiley-Blackwell.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). GENERIC ASSIGNMENTS, STRAIN HISTORIES AND PROPERTIES OF PURE CULTURES OF CYANOBACTERIA. *Journal of General Microbiology*, 111(MAR), 1-61.
- Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2–11. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1080/26388081.2020.1715256>
- Rusydi, R., Yakupitiyage, A., Gallardo, W. G., Dabbadie, L., & Anal, A. K. (2015). *Potential of Nostoc muscorum cultured in BG-11 medium as biodiesel feedstock source: Evaluation of nutrient requirement for culture and its daily lipid content*.
- Safi, C., Pollio, A. & Olivieri, G. (2021). *Neochloris oleoabundans* from nature to industry: a comprehensive review. *Rev Environ Sci Biotechnol* (20), 943–958. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09593-x>
- Saharan, B. S., Sharma, D., Sahu, R., Sahin, O., & Warren, A. (2013). TOWARDS ALGAL BIOFUEL PRODUCTION: A CONCEPT OF GREEN BIO ENERGY DEVELOPMENT. [Article]. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 12, 1-21.
- Sánchez-Borroto, Y., Piloto-Rodríguez, R., Goyos-Pérez, L., Ferrer-Frontela, N. (2012). Predicción del número de cetano de biocombustibles a partir de su composición de ácidos grasos. *Ingeniería Mecánica* 15(2) 147-157.

- Sanjurjo, C., Rivera, N., Rodríguez, E., Fernández-González, A., Hernández Battez, A. (2024). Biodiésel derived from the microalgae *Nannochloropsis gaditana* and *Haematococcus pluvialis*: Physicochemical and tribological properties. *Journal of Molecular Liquids* (408) 125391. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125391>.
- Santos, A. M., Lamers, P. P., Janssen, M., & Wijffels, R. H. (2013). Biomass and lipid productivity of *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions. *Algal Research*, 2(3), 204-211.
- Sarin, A., Arora, R., Singh, N. P., Sarin, R., Malhotra, R. K., & Kundu, K. (2009). Effect of blends of Palm-Jatropha-Pongamia biodiésels on cloud point and pour point. *Energy*, 34(11), 2016-2021.
- Sarkar, D., & Shimizu, K. (2015). An overview on biofuel and biochemical production by photosynthetic microorganisms with understanding of the metabolism and by metabolic engineering together with efficient cultivation and downstream processing. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 17.
- Shuba, Eyasu S., & Kifle, D. (2018). Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81(Part 1), 743-755.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Sivaramakrishnan, R., Kamaraj, B., Lan Chi, N. T., Cornejo, P. (2021). Cultivation of *Nostoc* sp. LS04 in municipal wastewater for biodiésel production and their deoiled biomass cellular extracts as biostimulants for *Lactuca sativa* growth improvement. *Chemosphere* (280) 130644. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130644>.
- Silva, D. A., Guimarães Cardoso, L., Silva, J. S. J, Oliveira de Souza, C., França Lemos, V., de Almeida, P. F., de Souza Ferreira, E., Lombardi, A. T., Druzian, J. I. (2022). Strategy for the cultivation of *Chlorella vulgaris* with high biomass production and biofuel potential in wastewater from the oil industry. *Environmental Technology & Innovation* (25) 102204. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102204>.
- Silva, H. R., Prete, C.E.C., Zambrano, F., de Mello, V. H., Tischer, C. A., Andrade, D. S. (2016). Combining glucose and sodium acetate improves the growth of

- Neochloris oleoabundans under mixotrophic conditions. *AMB Express*. Mar;6(1):10. doi: 10.1186/s13568-016-0180-5.
- Simbi, I., Aigbe, U. O., Oyekola, O. O., Osibote, O. A. (2022). Chemical and quality performance of biodiesel and petrol blends. *Energy Conversion and Management: X* (15) 100256. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2022.100256>.
- Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Sharma, S., & Kumari, D. (2019). Chemical compositions, properties, and standards for different generation biodiesels: A review. *Fuel*, 253, 60-71.
- Singh, S. P., & Singh, D. (2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 200-216.
- Singh, V., Chaudhary, D. K., Mani, I., & Dhar, P. K. (2016). Recent advances and challenges of the use of cyanobacteria towards the production of biofuels. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 60, 1-10.
- Su, Y. C., Liu, Y. A., Diaz Tovar, C. A., & Gani, R. (2011). Selection of Prediction Methods for Thermophysical Properties for Process Modeling and Product Design of Biodiesel Manufacturing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(11), 6809-6836.
- Sun, Y., Liu, J., Xie, T., Xiong, X., Liu, W., Liang, B., et al. (2014). Enhanced Lipid Accumulation by *Chlorella vulgaris* in a Two-Stage Fed-Batch Culture with Glycerol. *Energy & Fuels*, 28(5), 3172-3177.
- Thepsuthammarat, K., Imai, T., Plangklang, P., Sittijunda, S., Reungsang, A. (2024). Two-step polyhydroxybutyrate production from hydrogenic effluent by freshwater microalgae *Coelastrella* sp. KKU-P1 and *Acutodesmus* sp. KKU-P2 under mixotrophic cultivation. *Heliyon*, 10 (17), e37261. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37261>.
- Tutunea, D., Dumitru, I., Racila, L., Otat, O., Matei, L., & Geonea, I. (2019, 2019//). *Characterization of Sunflower Oil Biodiesel as Alternative for Diesel Fuel*. Paper presented at the Proceedings of the 4th International Congress of Automotive and Transport Engineering (AMMA 2018), Cham.

- Ussiri, D. A. N., & Lal, R. (2017). The Role of Bioenergy in Mitigating Climate Change. In D. A. N. Ussiri & R. Lal (Eds.), *Carbon Sequestration for Climate Change Mitigation and Adaptation* (pp. 433-495). Cham: Springer International Publishing.
- Velasquez-Orta, S. B., Lee, J. G. M., & Harvey, A. P. (2013). Evaluation of FAME production from wet marine and freshwater microalgae by in situ transesterification. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 83-89.
- Voltolina Lobina, D., & Arredondo Vega, B. O. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Wang, J., Yang, H., & Wang, F. (2014). Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiésel Production: Status and Prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3307-3329.
- Wen, Z.-Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273-294.
- Zutshi, S., & Fatma, T. (2015). Cyanobacteria. In D. Sahoo & J. Seckbach (Eds.), *The Algae World* (pp. 57-89). Dordrecht: Springer Netherlands.