



Posgrado en Biotecnología

Especialización en Biotecnología

Cultivo de microalgas en fotobiorreactor airlift para la obtención de
precursores de biodiesel

Presenta

IBI David Jesús Torres Mancera

Comité tutorial

DIRECTORA

Dra. Patricia Ruiz Sánchez

Profesora Titular

Depto. Biotecnología, No. económico: 34485
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

ASESOR

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Profesor Titular

Depto. Biotecnología, No. económico: 11371
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Resumen

Hoy en día la problemática debida a las demandas energéticas a nivel mundial ha dado paso a la búsqueda de fuentes alternativas de energía como el biodiesel. Estas alternativas están basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el medio ambiente. Así mismo, la implementación de procesos sustentables ofrece la opción de mitigar las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) y otros gases de efecto invernadero.

En este trabajo se estudió el cultivo de microalgas para la obtención de precursores de biodiesel (triacilglicéridos). Se realizó una detallada revisión bibliográfica sobre la ruta metabólica para la síntesis de triacilglicéridos en las microalgas, se analizaron los sistemas para el cultivo de microalgas y sus condiciones de cultivo como temperatura, pH, luz, nutrientes, el uso de fitohormonas, el mezclado y transferencia de masa.

Se utilizaron dos medios de cultivo, uno de formulación (Bristol 3N) y otro a base de un fertilizante comercial, Bayfolan (Bayer), con el objetivo de optimizar la concentración de biomasa usando como fuente de carbono CO₂. Como cepa de estudio se empleó *Chlorella protothecoides* UTEX 256. Se usaron tres de sistemas de cultivo: 1) fotobiorreactor cilíndrico de 1 L, 2) fotobiorreactor enchaquetado de 0.5 L y 3) fotobiorreactor tipo airlift.

A su vez se montaron técnicas analíticas para determinar la concentración de biomasa (g L⁻¹ o número de células mL⁻¹), concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, composición elemental de C y N en la biomasa, porcentaje de contenido lipídico (%_L), fijación de CO₂ en biomasa (R_C), productividad de biomasa (P_X) y lípidos (P_L).

En el fotobiorreactor cilíndrico se realizó una cinética de crecimiento de *C. protothecoides* para evaluar el crecimiento con medio Bristol 3N a 26±2°C, 400 ± 20 lux, ciclos de Luz/Oscuridad (L/O): 16/8 h, flujo 100 mL min⁻¹ (95% aire, 5% CO₂). Estimando una concentración de biomasa de 0.338 g L⁻¹ y una variación de pH de 6 ± 0.5.

Se montaron dos sistemas de cultivo en lote alimentado con fotobiorreactores enchaquetados de 0.5 L, uno con medio Bristol 3N y el otro con medio a base del fertilizante comercial Bayfolan las condiciones para ambos fotobiorreactores fueron: 26 ± 2 °C, 841-832 lux, L/O: 12/12, flujo de aire de 150 mL min⁻¹, se hizo una cinética de crecimiento de *C. protothecoides*. Se obtuvieron valores de concentración y productividad de biomasa para el caso del cultivo con medio Bristol 3N de 0.127 g L⁻¹ y 0.046 g L⁻¹ d⁻¹; en cambio el cultivo con Bayfolan los valores fueron de 0.390 g L⁻¹ y 0.0189 g L⁻¹ d⁻¹ respectivamente.

También, se estimó la fijación de CO₂ de *C. protothecoides* en fotobiorreactores enchaquetados resultando un valor de 0.5785 g L⁻¹ d⁻¹ para cultivo con medio Bristol 3N y 1.9584 g L⁻¹ d⁻¹ para el cultivo con medio Bayfolan. En base a la productividad de biomasa más alta, se evaluó el contenido y la productividad de lípidos de *C. protothecoides* cultivado en medio Bayfolan obteniendo valores de 2.24% y 4.29 g L⁻¹ d⁻¹ respectivamente.

En el fotobiorreactor tipo airlift se realizaron pruebas abióticas para determinar el k_{La} (CO₂) a flujos de aire de 100, 500, 1000 mL min⁻¹, obteniendo valores de 7.74 h⁻¹ y 12.57 h⁻¹ para 500 y 1000 mL min⁻¹ respectivamente. Se realizaron balances de materia de CO₂ para estimar la productividad de biomasa con resultados de 5.612 g L⁻¹ d⁻¹ y 11.973 g L⁻¹ d⁻¹ para los flujos de aire 500, 1000 mL min⁻¹.

Adicionalmente se realizaron pruebas de mezclado bióticas con en el fotobiorreactor tipo airlift para determinar el flujo de aire más adecuado para una buena suspensión celular de *C. protothecoides*. Utilizando tres flujos de aire: 500, 800 y 1400 mL min⁻¹ usando medio Bayfolan, a 26 ± 2 °C, 1000 ± 100 lx, L/O: 10/14 h, obteniendo una concentración de biomasa de 0.1126 g L⁻¹ en el flujo más alto.

La utilidad de este trabajo es presentar una alternativa que sustituya los medios de cultivo usados que principalmente son a base de formulación con el objetivo de emplear un medio de cultivo que sea más económicos para obtener mejores resultados y a su vez se utilice en sistemas de cultivos (fotobiorreactores) en donde se hayan obtenidos mejores resultados de concentración de biomasa, productividad de biomasa y de lípidos.

Índice de contenido

Resumen.....	1
1. Introducción	9
2. Antecedentes	10
2.1 Biocombustibles y microalgas.....	10
2.2 Ruta metabólica de síntesis de triacilglicéridos en las microalgas.....	10
2.3 Síntesis de biodiesel	12
2.4 Sistemas para el cultivo de microalgas.....	13
2.4.1 Sistemas abiertos y semiabiertos	13
2.4.2 Sistemas Cerrados.....	14
2.4.3 Condiciones para el cultivo de microalgas	16
Temperatura y pH	16
Intensidad de luz y ciclos de luz/oscuridad (L/O).....	17
Nutrientes	17
Fitohormonas	20
Mezclado y transferencia de masa	21
3. Justificación	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
6. Materiales y métodos	24
6.1 Cepa y mantenimiento celular en medio sólido	24
6.2 Propagación de <i>Chlorella protothecoides</i> en medio líquido	24
6.3 Preparación de precultivos	24
6.4 Determinación de biomasa por gravimetría-espectrofotometría en medio Bristol 3N.....	25
6.5 Determinación de biomasa por conteo de células-espectrofotometría en medio Bristol 3N	26
6.6 Determinación de biomasa por conteo de células-espectrofotometría en medio Bayfolan	27
6.7 Determinación de Carbono y Nitrógeno elemental en la biomasa.....	28
6.8 Determinación de la concentración de nitrógeno como nitrato en el medio de cultivo.	29
6.9 Determinación de lípidos totales en biomasa por el método de Folch.....	31

6.10 Determinación de productividad de biomasa, de lipídica y fijación de CO ₂ en la microalga	33
6.11 Descripción de los sistemas de cultivo	34
6.11.1 Sistema de cultivo con fotobiorreactor cilíndrico.....	34
6.11.2 Sistema de cultivo con fotobiorreactor enchaquetado	35
6.11.3. Sistema de cultivo con fotobiorreactor tipo artilift	36
6.11.4 Caracterización geométrica del fotobiorreactor tipo airlift	37
6.11.5 Determinación de k_{La} (CO ₂) y balance de materia de CO ₂ en condiciones bióticas.	39
7. Resultados y discusión	42
7.1 Evaluación del crecimiento de <i>Chlorella Protothecoides</i> en medio de cultivo Bristol 3N.....	42
7.2 Evaluación de crecimiento de <i>Chlorella protothecoides</i> con medio de cultivo Bristol 3N y Bayfolan. Evolución de la fuente de nitrógeno.	44
7.3 Productividad de biomasa, fijación de CO ₂ y contenido de nitrógeno elemental de <i>Chlorella protothecoides</i>	48
7.4 Productividad de lípidos en <i>Chlorella protothecoides</i> durante el cultivo en medio Bayfolan	50
7.5 Estimación de k_{La} en fotobiorreactor airlift en condiciones abióticas.	52
7.6 Balance de CO ₂ en fotobiorreactor airlift en condiciones abióticas.	54
7.7 Pruebas de mezclado de <i>Chlorella protothecoides</i> en fotobiorreactor airlift.....	56
8. Conclusiones	60
9. Perspectivas.....	61
10. Referencias.....	62
11. Anexos	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Condiciones de cultivo y valores de productividad de biomasa y contenido lipídico reportados para varias cepas de microalgas.	18
Tabla 2. Diluciones realizadas para la determinación de la curva estándar.	25
Tabla 3. Diluciones realizadas para la determinación de la curva estándar.	27
Tabla 4. Diluciones a partir de la solución madre (SM) para la determinación de la curva estándar.	30
Tabla 5. Datos de biomasa, de número de células y concentración de nitratos en el medio de cultivo obtenidos durante la cinética de crecimiento de <i>C. protothecoides</i>	46
Tabla 6. Composición elemental de C y N de <i>C. protothecoides</i> cultivada en medio Bristol 3N y Bayfolan.	48
Tabla 7. Productividad de biomasa (P_X) y fijación de CO_2 (R_C) de <i>C. protothecoides</i> que se cultivó en medio Bristol 3N y Bayfolan.	48
Tabla 8. Datos de concentración biomasa (X) y de número de células obtenidos en la evolución del cultivo de <i>C. protothecoides</i> en el fotobiorreactor tipo airlift.	59

Índice de Figuras

Figura 1. Biosíntesis de lípidos en células de microalgas.....	12
Figura 2. Reacción química de la transesterificación, R1, R2, R3 y R' son radicales alquilo.....	13
Figura 3. Principales sistemas de cultivo de microalgas abiertos (a) y semiabiertos (b)	14
Figura 4. Sistemas de cultivo cerrados: tanque agitado (a), columna burbuja (b) y airlift (c).....	14
Figura 5. Configuraciones de fotobiorreactores tipo airlift: circulación interna (a) y externa (b).	15
Figura 6. Curva estándar de biomasa g L^{-1} vs. DO_{750}	26
Figura 7. Cuadrantes utilizados para el conteo de células.	26
Figura 8. Curva estándar de No. Células mL^{-1} vs. DO_{750}	27
Figura 9. Curva estándar de número de células mL^{-1} vs. DO a 750 nm.....	28
Figura 10. Reacción de combustión realizada por el analizador CHN.....	29
Figura 11. Barrido espectrofotométrico de N-NO_3^{-1} por triplicado del medio con dilución 1:100.	29
Figura 12. Curva estándar de N-NO_3^{-} vs. DO_{205}	31
Figura 13. Diagrama del sistema de cultivo; componentes: 1. Sistema de aireación, 2. Fotobiorreactor cilíndrico de 1 L y, 3. Sistema de iluminación LED.....	34
Figura 14. Diagrama de fotobiorreactor cilíndrico; componentes: 1. Puerto de aireación, 2. Puerto de muestreo, 3. Tapón de algodón (purga), 4 Botella de 1 L, 5. Agitador magnético.....	35
Figura 15. Diagrama del sistema de cultivo donde: 1. Sistema de aireación, 2. Sistema de control de temperatura, 3. Fotobiorreactor enchaquetado 4. Sistema de iluminación y, 5. Sistema de agitación.....	35
Figura 16. Diagrama de fotobiorreactor enchaquetado, componentes: 1. Puerto de alimentación; 2. Puertos de purga; 3. Puerto de muestreo; 4 Puerto de aireación: 5. Puerto de salida de chaqueta; 6. Puerto de entrada de chaqueta; 7. Chaqueta.	36
Figura 17. Diagrama del sistema de cultivo donde: 1. Sistema de aireación, 2. Sistema de control de temperatura, 3. Fotobiorreactor airlift y, 4. Sistema de iluminación.....	36
Figura 18. Diagrama de fotobiorreactor airlift, componentes: 1. Base, 2. Puerto de aireación, 3. Puerto de muestreo, 4 Puerto de entrada de chaqueta, 5. Chaqueta, 6. Puerto de salida de chaqueta, 7. Tubo concéntrico, 8. Puerto de purga, 9. Tapa de media luna.....	37

Figura 19. Dimensiones del fotobiorreactor airlift.	38
Figura 20. Diagrama de las dimensiones que se toman en cuenta en la geometría del airlift.....	38
Figura 21. Esquema del sistema experimental: 1. Fotobiorreactor airlift, 2. Columna de sílica, 3. Bomba de aire, 4. Respirómetro (MX/a/2013/004638).	40
Figura 22. Sistema de cultivo para el crecimiento de <i>C. protothecoides</i> en fotobiorreactor cilíndrico a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 400 ± 20 lux, L/O: 16/8, flujo 100 mL min^{-1} (95% aire, 5% CO_2).	42
Figura 23. Curva de crecimiento de <i>C. protothecoides</i> , biomasa (g L^{-1}) (\blacklozenge) y evolución del pH (\blacklozenge) en medio Bristol 3N.....	43
Figura 24. Foto del sistema utilizado para el cultivo de <i>C. protothecoides</i> a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 841-832 lux, L/O: 12/12, flujo de aire de 150 mL min^{-1}	44
Figura 25. Cultivo de <i>C. protothecoides</i> en medio Bristol 3N y evolución del pH.	45
Figura 26. Cultivo de <i>C. protothecoides</i> en medio Bayfolan y evolución del pH.	45
Figura 27. Evolución del consumo de nitratos en la cinética de <i>C. protothecoides</i> en los dos medios.....	46
Figura 28. Separación de la fase orgánica (lípidos) de la inorgánica a partir de biomasa seca liofilizada de <i>C. protothecoides</i>	50
Figura 29. Evolución de CO_2 (%) con respecto al tiempo a tres flujos: 100, 500 y 1000 mL min^{-1}	52
Figura 30. Gráfica para el cálculo de $k_{L,a\text{CO}_2}$ con flujo de 500 mL min^{-1}	53
Figura 31. Gráfica para el cálculo de $k_{L,a\text{CO}_2}$ con flujo de 1000 mL min^{-1}	53
Figura 32. Diagrama del balance del fotobiorreactor airlift a un flujo de 500 mL min^{-1}	54
Figura 33. Diagrama del balance del fotobiorreactor airlift a un flujo de 1000 mL min^{-1}	55
Figura 34. Sistema de cultivo de <i>C. protothecoides</i> en el fotobiorreactor tipo airlift a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 1000 ± 100 lx, L/O: 10/14 h, y flujo de 500, 800 y 1400 mL min^{-1}	56
Figura 35. Evolución de pH y <i>C. protothecoides</i> en fotobiorreactor tipo airlift a flujo de 500 mL min^{-1}	57
Figura 36. Evolución de <i>C. protothecoides</i> en fotobiorreactor tipo airlift a flujo de 800 mL min^{-1} y evolución de pH.	57
Figura 37. Evolución del pH y en número de células Cultivo de <i>C. protothecoides</i> en fotobiorreactor tipo airlift a flujo de 1400 mL min^{-1} y evolución de pH.....	58

Índice de símbolos y abreviaturas

$\%_h$ = porcentaje de humedad de la muestra.

$\%_L$ = Porcentaje de lípidos total

$\%_{Lh}$ = Porcentaje de lípidos totales en base húmeda

$\%_{Ls}$ = Porcentaje de lípidos totales en base seca

A_{CO_2} = Flujo acumulado de CO_2 ($mL \text{ min}^{-1}$)

C_C = Porcentaje de carbono elemental de biomasa microalgal

DO = Densidad óptica

DO_{205} = Densidad óptica a 205 nm

DO_{750} = Densidad óptica a 750 nm

E_{CO_2} = Flujo de entrada de CO_2 ($mL \text{ min}^{-1}$)

$k_{La} (CO_2)$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de masa del CO_2

L/O = Ciclos de luz y oscuridad

m_1 = Peso del matraz vacío

m_2 = Peso del matraz con lípidos.

m = Peso de la muestra

M_C = Peso molecular del carbono ($g \text{ mol}^{-1}$)

M_{CO_2} = Peso molecular de CO_2 ($g \text{ mol}^{-1}$)

$N-NO_3^-$ = Nitrógeno en forma de nitrato ($mg \text{ L}^{-1}$)

n = Tiempo de cultivo (d)

nm = nanómetros

P_L = Productividad de lípidos ($g \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)

P_X = Productividad de biomasa ($g \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)

R^2 = Coeficiente de correlación

R_C = La estimación de la fijación de CO_2

S_{CO_2} = Flujo de salida de CO_2 ($mL \text{ min}^{-1}$)

SM = Solución madre

X_0 = La concentración de biomasa al inicio ($g \text{ L}^{-1}$)

X = Concentración de biomasa ($g \text{ L}^{-1}$)

X_{max} = Concentración máxima de biomasa ($g \text{ L}^{-1}$)

1. Introducción

Actualmente se están buscando alternativas sustentables para la obtención de fuentes de energía renovables, la síntesis de biodiesel a partir de lípidos obtenidos de la biomasa microalgal representa una alternativa interesante. Las microalgas son microorganismos fotosintéticos capaces de utilizar el CO₂ como fuente de carbono, por lo que su utilización representa una alternativa para el desarrollo de un proceso sustentable para la elaboración de biocombustibles.

Existen más de 300000 especies de microalgas cuya diversidad es mayor que las plantas superiores y generalmente son más eficientes en convertir la energía solar que las plantas superiores (Scott et al. 2010) ya que son microorganismos fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química por medio de la fijación de CO₂ con una eficiencia superior a la de las plantas (Al-Iwayzy et al. 2014) esto debido a que estas se encuentran suspendidas en el medio donde crecen haciendo que la captación de luz y de CO₂ sea de forma fácil (Dragone et al. 2010 y Chisti 2007).

Uno de los biocombustibles más usados es el biodiesel, actualmente se elabora a partir de aceite vegetal (biocombustibles de primera generación) o bagazo de caña (biocombustibles de segunda generación). Por otro lado, las microalgas mediante procesos metabólicos producen aceites como los triacilglicéridos (TAG's), los cuales son precursores para la síntesis de biodiesel y pertenecen a los biocombustibles de tercera generación (Chun-Yen et al. 2011). Además, las microalgas son capaces de fijar CO₂ como fuente de carbono proveniente de gases de efecto invernadero.

En este estudio se presenta la optimización de los medios de cultivos utilizados usualmente para el crecimiento de microalgas ya que se han utilizados medios específicos a base de formulación que son difíciles de realizar, el medio Bristol por lo regular es el medio base en microalgas de agua dulce para cultivar, en base a este medio se han realizado otras variantes modificando su formulación ya sea agregando más compuestos o fuentes de carbono como por ejemplo proteosa pepetona. Se plantea utilizar un medio a base de fertilizante comercial de Bayfolan producido por Bayer y hacer una comparación de crecimiento y productividad utilizando estos dos medios.

2. Antecedentes

2.1 Biocombustibles y microalgas

Hoy en día alrededor del 80% de la demanda mundial de energía se produce a partir de combustibles fósiles. Sin embargo, el exceso en la utilización de éste ha llevado a la disminución de reservas de petróleo, al cambio climático, a la contaminación ambiental mediante la producción de dióxido de carbono (CO₂) y ha provocado problemas de salud a la población en general (Chun-Yen et al. 2011). Recientemente se han estado buscando fuentes alternativas de energía renovables que sean amigables con el medio ambiente. Los biocombustibles han tomado un mayor interés y se espera que tengan un papel fundamental en la infraestructura global de energía en el futuro (Chun-Yen et al. 2011).

Las microalgas son organismos unicelulares pueden ser procariontas como *Spirulina platensis*, *Spirulina máxima* y eucariotas como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus sp.*, entre otras. Dentro de los metabolitos de interés sintetizados por las microalgas se encuentran proteínas, pigmentos como clorofila *a*, astaxantina y triacilglicéridos. Estos últimos, están compuestos de tres ácidos grasos simples cada uno unido por un enlace éster al glicerol, el cual es un alcohol de tres carbonos. Los triacilglicéridos simples están compuestos por tres ácidos grasos iguales en tanto los triacilglicéridos naturales están compuestos por tres ácidos grasos mixtos que contienen dos o más ácidos grasos diferentes. Debido a los hidroxilos polares del glicerol y los carboxilatos polares de los ácidos grasos que están unidos por enlaces éster, los triacilglicéridos son moléculas hidrofóbicas no polares, esencialmente insolubles en agua (Nelson and Cox, 2011).

2.2 Ruta metabólica de síntesis de triacilglicéridos en las microalgas

El metabolismo lipídico en las microalgas es similar al de las plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La

reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16 y 18 carbonos (16C y 18C) saturadas. Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 ω 9, con doble enlace en el carbono 9 contando desde el último carbono) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación. Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triacilglicéridos (TAG's) sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la desfosforilación del ácido fosfatídico previamente formado (Garibay Hernández et al. 2009).

En la Figura 1 se muestra un esquema de la biosíntesis de lípidos microalgales; en términos generales, en el sistema fotosintético a partir de la energía proporcionada por los fotones presentes en el flujo luminoso, se lleva a cabo la oxidación catalítica del agua con la consecuente formación de protones, electrones y O₂, los cuales a su vez posibilitan la obtención de los productos fotosintéticos: ATP y NADPH. Estos productos fotosintéticos son el sustrato del Ciclo de Calvin en el cual el CO₂ es fijado en moléculas de 3 átomos de Carbono (3 C), las cuales a su vez son asimiladas como carbohidratos, lípidos y proteínas. En el caso particular de los lípidos microalgales, las moléculas de 3 C son transformadas a piruvato y acetil-CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas y sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y β -reducción para la síntesis de ácidos grasos (grupos acilo: ACIL-ACP). El mecanismo de transporte de ácidos grasos al exterior del citoplasma se desconoce. Posteriormente, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde algunos intermediarios son desviados hacia la síntesis de lípidos de membrana (Garibay Hernández et al. 2009).

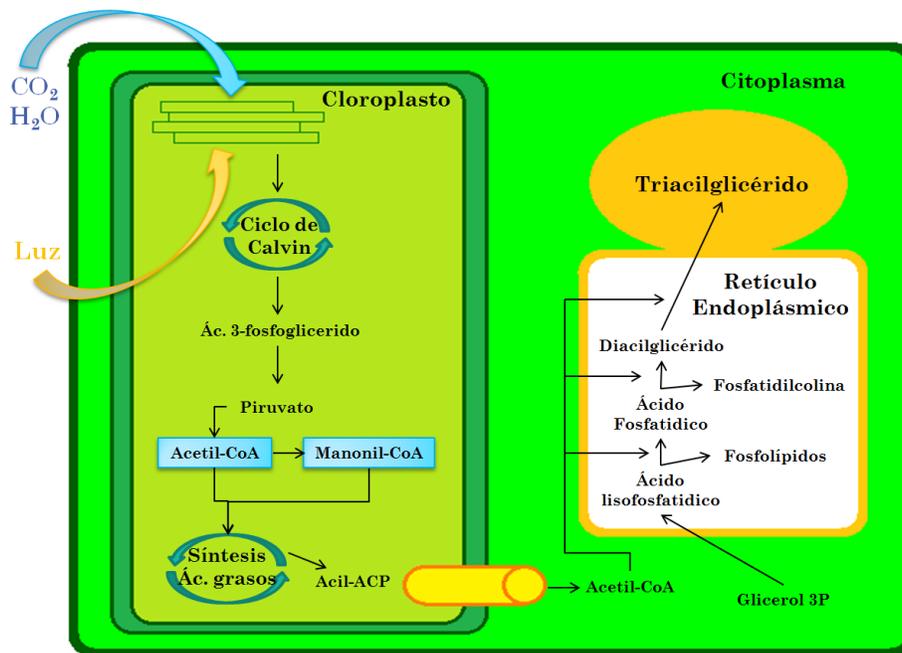


Figura 1. Biosíntesis de lípidos en células de microalgas.

Las microalgas producen triacilglicéridos cuando se encuentran en condiciones de estrés. Estas pueden ser químicas, como cambios en el pH, deficiencia de nutrientes en el medio o por salinidad en casos de microalgas marinas; también, pueden ser físicas como cambios bruscos de temperatura y cambios en los ciclos de luz-oscuridad.

2.3 Síntesis de biodiesel

Hoy en día hay cuatro métodos que son utilizados para la elaboración de biodiesel: a partir de aceites vegetales o mezclas de estos con diesel fósil, microemulsiones, pirolisis y transesterificación. El uso de estas tres primeras en motores diesel es muy impráctica e insatisfactoria, ya que ocasiona problemas tales como: la obstrucción de los inyectores, la formación de depósitos de carbono, combustión incompleta, golpeteo en el motor ocasionando desgaste excesivo del mismo y daño del lubricante (Garibay Hernández et al. 2009).

En cambio, la transesterificación o alcoholisis (Figura 5) es la reacción química entre los aceites (triacilglicéridos) y un alcohol (comúnmente metanol, etanol, propanol o butanol) para producir glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos, mejor conocidos como biodiesel (Garibay Hernández et al. 2009).

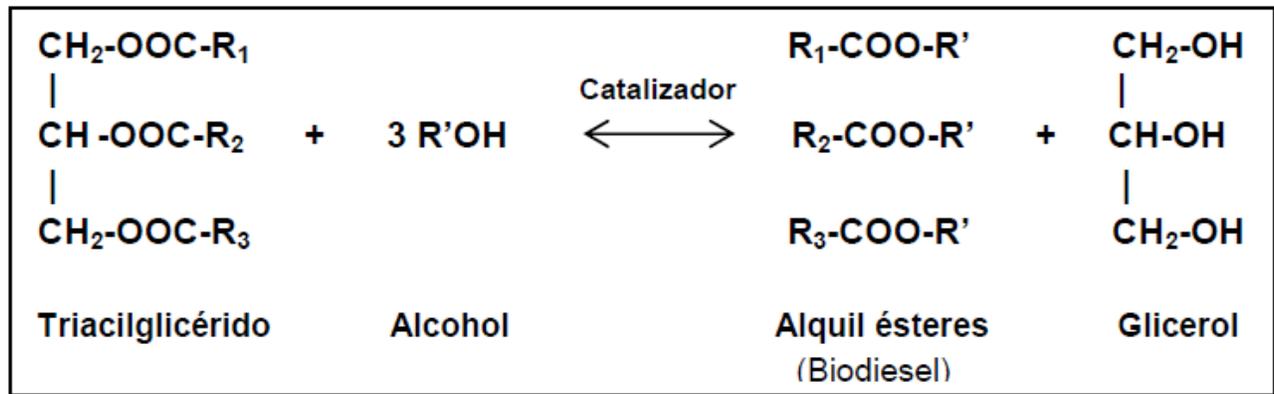


Figura 2. Reacción química de la transesterificación, R1, R2, R3 y R' son radicales alquilo.

El catalizador usado para la reacción en la Figura 2 pueden ser un álcali, un ácido y enzimas (lipasas). Los factores que influyen en el proceso es la relación molar alcohol/glicéridos, el tipo de catalizador, temperatura, tiempo de reacción, el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima (Garibay Hernández et al. 2009).

2.4 Sistemas para el cultivo de microalgas

Los sistemas de cultivo para microalgas pueden ser abiertos, los cuales se caracterizan por estar en espacios abiertos en el exterior y son iluminados por la radiación solar; de igual, manera los sistemas semiabiertos son iluminados por energía solar, pero estos permanecen cerrados al exterior. Los sistemas de cultivo cerrados e iluminados por la luz artificial se les denominan fotobiorreactores. En estos últimos el cultivo no tiene contacto con el exterior, esto permite mantener condiciones controladas para el crecimiento de microalgas (Cruz Muñoz, 2014 y Tan et al. 2017).

2.4.1 Sistemas abiertos y semiabiertos

Los sistemas abiertos y semiabiertos como su nombre lo indica son aquellos que están al aire libre. Su principal medio de agitación es por vía mecánica ya sea por propelas en caso de los sistemas abiertos o por bombas de agua en sistemas semiabiertos, su principal fuente de luz es el sol. Los sistemas abiertos más usados son los de tipo carrusel como se muestra en la Figura 3a y en los sistemas semiabiertos se usan los biorreactores tubulares inclinados que se muestran en la Figura 3b.

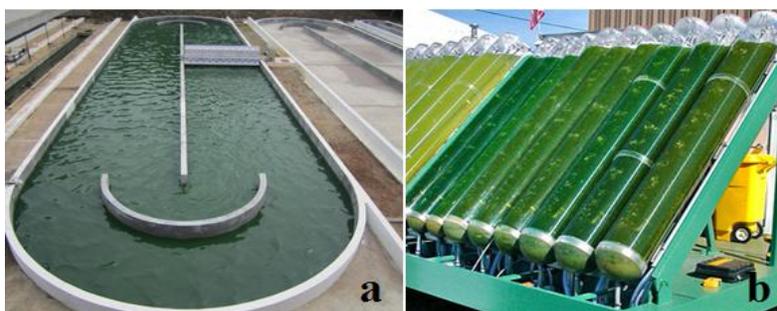


Figura 3. Principales sistemas de cultivo de microalgas abiertos (a) y semiabiertos (b)

Para sistemas tipo carrusel se han obtenido productividades de biomasa de $17.58 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ utilizando *Chlorella sp.* con una capacidad de 1000 L (Qiaoning He et al. 2016) y en fotobiorreactores tubulares han tenido producciones de biomasa de $16.84 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ es un cultivo mixto de dos cepas del género *Chlorella* y dos de *Scenedesmus* a un volumen de operación de 1700 L (Matthes et al. 2015).

2.4.2 Sistemas Cerrados

Estos sistemas también llamados fotobiorreactores están aislados del medio ambiente, su iluminación es a base luz artificial ya sea por luz fluorescente o LED (Light-Emitting Diode) y pueden ser tanque agitado, columna burbuja y tipo airlift, en la Figura 4 se muestran los diferentes tipos de sistemas. En estos sistemas por lo general la forma de agitación es mediante la inyección de aire o mezcla de gases a excepción de los tanque agitados que son de manera mecánica.

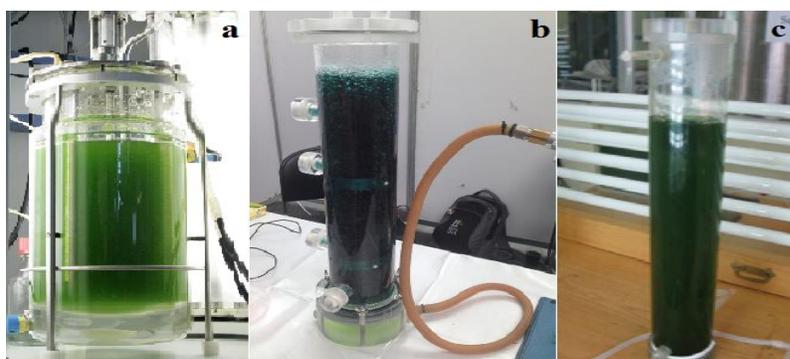


Figura 4. Sistemas de cultivo cerrados: tanque agitado (a), columna burbuja (b) y airlift (c).

En sistemas cerrados con cultivos de *Chlorella sp.* usando fotobiorreactores tipo burbuja se ha obtenido una concentración de biomasa de 2.3 g L^{-1} y para tipo airlift de 2.5 g L^{-1} ambos

fotobiorreactores con capacidad de 4 L (Sheng-Yi et al. 2009). A continuación, hablaremos de manera más específica acerca de los fotobiorreactores tipo airlift

Un fotobiorreactor tipo airlift es un equipo agitado neumáticamente que se caracteriza por que el suministro de energía para mantener homogeneidad en su interior tiene lugar mediante la expansión isotérmica del flujo de aire introducido a la fase líquida (Lizardi Jiménez, 2011).

En este tipo de fotobiorreactores la fluidización de sólidos no es una consecuencia directa del burbujeo del gas, sino que es, más bien, debida a la circulación del líquido dentro del fotobiorreactor dando como resultado una fluidización de sólidos muy simple, de alta eficiencia y permiten establecer ambientes internos con esfuerzos de corte aproximadamente constantes en todo el sistema.

Existen dos configuraciones básicas de airlift (Lizardi Jiménez, 2011): circulación interna (Figura 5a) que posee un tubo concéntrico que separa el cuerpo principal del fotobiorreactor y; el de circulación externa (Figura 5b) que tiene un “loop” o brazo de descenso con un diámetro generalmente menor que el del cuerpo principal del fotobiorreactor.

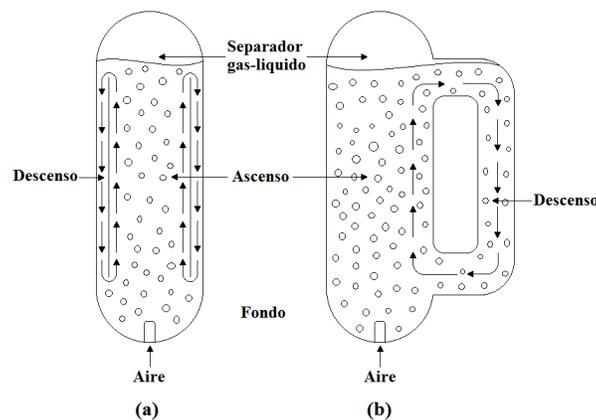


Figura 5. Configuraciones de fotobiorreactores tipo airlift: circulación interna (a) y externa (b).

Dentro del sistema del fotobiorreactor airlift se pueden distinguir cuatro zonas de circulación de líquido. La primera que es la zona de ascenso que es en donde se inyecta el gas, en esta zona es en donde se tienen los coeficientes de retención de la fase gaseosa más altos. Después de la zona de ascenso el líquido llega a una zona de separador gas-líquido en donde el gas sale de la fase líquida, luego el líquido entra a la zona de descenso en donde el líquido baja hasta la zona del fondo y se repite el ciclo de circulación. Esta circulación es debida a las diferencias de los coeficientes de retención de las fases gaseosas de la zona de ascenso y descenso; esto está determinado, entre otros factores, a la geometría del fotobiorreactor (Lizardi Jiménez, 2011).

Otro factor importante que se debe considerar es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}). Estudios anteriores (Mehrnia et al. 2005; Shariati et al. 2007) destacan el papel del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la líquida (k_{LaO_2}) como criterio de diseño y operación. El k_{LaO_2} es una medida de la capacidad del fotobiorreactor airlift basada en su diseño para la transferencia de oxígeno. Por otro lado, el mezclado es un proceso que consume energía, y en el caso del airlift ésta es provista por la agitación que proporciona la aireación (Nielsen et al. 2003). En general, a medida que la magnitud del Número de Reynolds (Re) aumenta, mayor será la fuerza y energía utilizadas para mover al fluido, y con esto el nivel de turbulencia provocado también será mayor, conduciendo a su vez a un mejor mezclado favoreciendo la transferencia de masa. El k_{LaO_2} y el Re, a su vez están fuertemente correlacionados. Esta correlación, es debida al efecto directo que tiene el Re sobre el espesor de la capa límite entre las fases que intercambian masa, de aquí que las tasas de transferencia de masa resulten importantes parámetros a considerar ya que incluyen no solo a los coeficientes k_{LaO_2} sino también la concentración del sustrato o sustratos (Lizardi Jiménez, 2011)

2.4.3 Condiciones para el cultivo de microalgas

Las condiciones para la síntesis de biomasa y de metabolitos dependen del género y especie de la microalga. Entre las principales condiciones se tienen: la temperatura, el pH, la intensidad de luz (periodos de luz y oscuridad), concentración de nutrientes (carbono, nitrógeno), fitohormonas, mezclado y la hidrodinámica en el fotobiorreactor.

Temperatura y pH

En los sistemas abiertos la temperatura a la cual estos operan es la ambiental, esto afecta al crecimiento debido a que las microalgas son sensibles a los cambios de temperaturas. En cambio, en sistemas cerrados, la temperatura se puede controlar manteniendo el fotobiorreactor en cámaras con temperatura controlada o enchaquetados. Comúnmente, los cultivos de microalgas de agua dulce del género *Chlorella* y *Scenedesmus* toleran temperaturas de 16 a 27 °C; a temperaturas menores a 16 °C el crecimiento disminuye, mientras que a temperaturas mayores a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies de este tipo (Mehlitz, 2009).

El pH es un parámetro muy importante ya que las microalgas crecen en un intervalo de 6.0-9.0 dependiendo del tipo de cepa, este puede variar por la presencia en el medio acuoso de las diferentes formas iónicas (CO_3^{-2} , HCO_3^{-1}) presentes por el metabolismo de la microalga. También, el CO_2 se

puede disociar en forma de ion carbonato el cual puede que provocar el aumento de pH en el medio de cultivo (Cruz Muñoz, 2014 y Pires et al. 2017).

Intensidad de luz y ciclos de luz/oscuridad (L/O)

El tipo de luz y la intensidad luminosa ya sea por radiación solar o luz blanca artificial como la fluorescente o tipo LED (Light-Emitting Diode) son factores críticos para el rendimiento del crecimiento fototrófico de las microalgas (Cruz Muñoz, 2014 y Pires et al. 2017). De igual manera, los ciclos de luz y oscuridad son importantes, ya que durante la fase de luz las microalgas realizan la fotosíntesis mientras que en la fase oscura efectúan la respiración (Nelson y Cox, 2005).

Nutrientes

Los nutrientes se dividen en macronutrientes y micronutrientes que las microalgas incorporan a su estructura celular, los cuales utilizan para formar biomasa y metabolitos. Los macronutrientes son los elementos limitantes del crecimiento (Rodríguez y Serrano, 2012), estos son N, P, C, H, Ca, Mg, S, K; mientras que los micronutrientes son los elementos que utiliza las células para un óptimo crecimiento (Rodríguez y Serrano, 2012) estos son principalmente: Fe, Mn, Cu, Mo, Co.

Los nutrientes más utilizados en la preparación de medios de cultivo para microalgas son nitratos, sulfatos y fosfatos como principales fuentes de N, S y P respectivamente, dependiendo de la cepa se puede agregar al medio otros componentes tales como carbonatos, vitaminas y trazas de metales (Cruz Muñoz, 2014 y Tan et al. 2017).

Uno de los macroelementos más importantes para las microalgas después del carbono es el nitrógeno, este es asimilado a partir de fuentes como amoníaco, nitratos, nitritos y urea, la diferencia entre el uso de una u otra fuente repercute en la velocidad específica de crecimiento y en la acumulación de lípidos (Chih-Hung y Wen-Teng, 2009. Castilla, 2010).

Se sabe que el nitrógeno es un elemento importante en la síntesis de lípidos en las microalgas ya que se ha visto que en medios de cultivo con baja concentración de nitrógeno aumenta la productividad de los lípidos; sin embargo, presentan bajos niveles de concentración de biomasa (Courchesne, et al. 2009 Binnal, 2017), el nitrógeno es un elemento importante en la fotosíntesis, a bajas concentraciones se detiene el proceso de captación luz en las microalgas; también, está ligado a la producción de aminoácidos para proteínas (González, 2010). Es importante que la concentración de nitrógeno en el medio para su asimilación en las microalgas sea la más adecuada.

La síntesis de biomasa y de lípidos dependen del tipo de microalga, así como de la concentración de nutrientes, principalmente (carbono y nitrógeno). En la Tabla 1 se muestran datos reportados de la productividad de biomasa y de lípidos, así como las principales condiciones de cultivo y el tipo de fuente de carbono utilizado durante el cultivo de diferentes microalgas (Chun-Yen et al. 2011).

Tabla 1. Condiciones de cultivo y valores de productividad de biomasa y contenido lipídico reportados para varias cepas de microalgas.

Microalga	Condición de cultivo	Productividad de biomasa (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Contenido Lipídico (% p/p)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referencia
<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 572	Fotótrofa ^a	0.03	20.8	5.5	Yoo et al. (2010)
<i>Chaetoceros calcitrans</i> CS 178	Fotótrofa ^a	0.04	39.8	17.6	Rodolfi et al. (2009)
<i>Chaetoceros muelleri</i> F&M-M43	Fotótrofa ^a	0.07	33.6	21.8	Rodolfi et al. (2009)
<i>Chlorella protothecoides</i> CCAP 211/8D	Fotótrofa ^a	0.002–0.02	11.0–23.0	0.2–5.4	Illman et al. (2000)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterótrofa	2.2–7.4	50.3–57.8	1209.6–3701.1	Xiong et al. (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i> #259	Fotótrofa ^a	0.01	33.0–38.0	4.0	Liang et al. (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> #259	Heterótrofa ^{c,d}	0.08–0.15	23.0–36.0	27.0–35.0	Liang et al. (2009)
<i>Nannochloris</i> sp. UTEX LB1999	Fotótrofa ^a	0.04–0.35	29.9–40.3	15.6–109.3	Takagi et al. (2000)
<i>Neochloris oleoabundans</i> UTEX 1185	Fotótrofa ^a	0.31–0.63	7.0–40.3	38.0–133.0	Li et al. (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i> FCTU Coimbra	Fotótrofa ^b	0.09	17.7	15.9	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Spirulina maxima</i> LB 2342	Fotótrofa ^b	0.21	4.1	8.6	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34	Fotótrofa ^a	0.30	14.7	43.4	Rodolfi et al. (2009)
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CS 173	Fotótrofa ^a	0.08	20.6	17.4	Rodolfi et al. (2009)

Los superíndices indican las fuentes de carbono: a: CO₂, b: Aire, c: Glucosa, d: Acetato

Existen varias condiciones cultivo, la más importante es la fuente de carbono. Así, se tienen condiciones fotótrofas que se caracterizan principalmente por el uso de una fuente de carbono inorgánica (CO₂) y una fuente de energía luminosa, con el propósito de favorecer el proceso de fotosíntesis (Chun-Yen et al. 2011).

Las microalgas pueden crecer en condiciones heterótrofas en donde la fuente de carbono es proporcionada por un compuesto orgánico en presencia de luz (fotoheterótrofas) o en ausencia de luz (quimioheterótrofas) usando también como fuente de energía el carbono orgánico. Las microalgas

pueden utilizar varias fuentes de carbono orgánico como: glucosa, acetato, glicerol, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa y manosa (Chun-Yen et al. 2011).

Las microalgas son capaces de crecer en condiciones de mixotrofia que es una combinación de las condiciones de autotrofia y heterotrofia en donde la presencia de la fuente de carbono es tanto orgánica como inorgánica (Chun-Yen et al. 2011). Se ha reportado que las microalgas cultivadas bajo estas condiciones presentan un rendimiento energético mayor que en condiciones fotótrofas, fotoheterótrofas y quimioheterótrofas (Chojnacka and Rocha, 2004).

Los datos presentados en la Tabla 1 indican que los generos de *Chlorella*, *Batryococcus*, *Scenedesmus* resultan interesantes para la obtención de lípidos ya que presentan una mayor productividad en lípidos. Como se puede ver en la Tabla 1 *S. obliquus* FCTU Coimbra muestra un contenido de lípidos del 17.7 % en peso seco y *B. braunii* UTEX 572 de 20.8 % en peso seco. El género *Chlorella* es una microalga verde unicelular de agua dulce, carece de flagelo y pertenece a la división de las Chlorophytas. Es uno de los géneros más usados para la síntesis de TAG's de interés para la obtención de biodiesel. Como se muestra en la Tabla 1, *C. protothecoides* (Xiong et al. 2008) presenta un porcentaje elevado el contenido lipídico de entre 50.3-57.8 % en peso seco.

La concentración de biomasa y la productividad de triacilglicéridos en fotobiorreactores depende del medio de cultivo utilizado, por ejemplo; para el género de microalgas de *Chlorella*, uno de los medios de referencia utilizados es el medio modificado Bristol 3N. En medios parecidos a Bristol 3N se pueden obtener concentraciones de biomasa de $1,19 \text{ g L}^{-1}$ (Kuan-Chen et al. 2013) con medio proteosa a 25 °C, pH de medio de 6,8 con periodos de Luz/oscuridad (L/O) de 12/12 h. Por lo que para optimizar la concentración en biomasa y por tanto en triacilglicéridos se han realizado estudios en los que se han utilizado otras fuentes de nitrógeno para optimizar la síntesis de biomasa, por ejemplo: amoníaco, nitratos, nitritos y urea (Rodrigo Gonzales y Serrano Luna, 2012). Una propuesta interesante sería el uso de fertilizantes inorgánicos fóliales como fuente de nitrógeno, estos compuestos contienen vitaminas y fitohormonas que favorecen el crecimiento de la microalga. Las ventajas que tiene los fertilizantes es que son medios ya formulados sin necesidad de agregar otro compuesto, son baratos y fáciles de conseguir; sin embargo, al ser fertilizantes la concentraciones de sus componentes que por lo regular están dados en porcentaje peso/peso (p/p) en contenido elemental, no tienen especificaciones de que compuestos o reactivos son utilizados para su preparación.

Fitohormonas

Las fitohormonas son una clase de estimulantes que influyen en los procesos de crecimiento y actividad celular en plantas superiores (Voß et al. 2014). Las fitohormonas pueden promover o inhibir determinados procesos, dentro de las que promueven una respuesta existen 4 grupos principales:

- **Giberelinas.** Son moléculas complejas de diterpenos tetracarboxílicos (cassán et al. 2008), afectan el desarrollo de la planta promoviendo la división celular, la elongación y están ligadas en romper la dormancia vegetal.
- **Citocininas.** Son una clase de fitohormonas de tipo purina (cassán et al. 2008), que promueven la división celular, la morfogénesis de brotes y raíces, la maduración del cloroplasto y el agrandamiento celular.
- **Auxinas.** Son fitohormonas que regulan el proceso de crecimiento en las plantas (Spaepen y Vanderleyden, 2010), una de las auxinas más importantes es el ácido indol-3-acético.
- **Etileno.** Facilita la maduración de los frutos, la degradación de la clorofila y la posterior caída de las hojas (McSteen y Zhao 2008).

Recientemente, se ha reportado que las fitohormonas tienen efectos significativamente estimulantes sobre el crecimiento y los metabolitos, como los lípidos, las proteínas y los carbohidratos en las microalgas (Poonam et al. 2016).

Salama y colaboradores en 2014 reportaron el efecto de dos fitohormonas, el ácido indol-3-acético (IAA) y el hexanoato de dietil aminoetilo (DAH), sobre el crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus*, observaron que el crecimiento de microalgas se acelera y promueven la calidad y cantidad de ácidos grasos para la producción de biodiesel. Por otra parte, Liu y colaboradores (2017) encontraron que la suplementación exógena de 1-naftilacética (NAA) tuvo un efecto notable sobre el crecimiento celular y la biosíntesis de lípidos de *C. vulgaris*. Además, se descubrió que el ácido indol-3-butírico (IBA) y NAA también tienen efectos estimulantes similares sobre la composición celular de *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus quadricauda* (Liu et al. 2016).

El uso de fitohormonas en microalgas se utiliza sobre todo para estimular el crecimiento de las microalgas en medios de cultivo con baja concentración de la fuente de nitrógeno (Yu et al. 2018). Esto debido a que a baja concentración de nitrógeno las microalgas entran en estado de estrés y empiezan a tener una mayor actividad metabólica para producir lípidos, por lo tanto, se emplean fitohormonas con el objetivo de estimular el crecimiento microagal y así no se vea afectada la concentración de biomasa por falta de una fuente de nitrógeno.

Mezclado y transferencia de masa

En sistemas abiertos, para realizar el mezclado y favorecer la transferencia de masa, por lo general, se emplean paletas, las cuales homogenizan el contenido del cultivo en el sistema. En sistemas cerrados como los fotobiorreactores de tipo columna de burbujas y airlift, el mezclado se realiza por burbujeo del aire, en estos las burbujas provocan la agitación favoreciendo la transferencia de masa, sin necesidad de usar paletas o hélices.

La agitación es muy importante ya que si se optimiza adecuadamente mejora la productividad en biomasa al aumentar la frecuencia de exposición de las células a claros y oscuros, aumentan la transferencia de masa de los nutrientes a la célula (Chisti and Jauregui-Haza, 2002).

El coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{LA}) es una de las características que determina la capacidad del reactor para sostener el crecimiento celular óptimo. El comportamiento de k_{LA} y la velocidad de crecimiento celular varían en diferentes zonas del flujo de líquido. Estas zonas de flujo de líquido en fotobiorreactores pueden dividirse en zona de flujo de burbujas, y zona de transición heterogénea y dependerá de la velocidad del gas (Ramírez Mérida et al. 2013).

En la zona de flujo de burbuja, la capacidad de retención del gas, el área interfacial y el k_{LA} son proporcionales a la velocidad superficial del gas. Aunque la disminución en el área interfacial comienza con el movimiento que va desde la zona de transición a la zona heterogénea, sin embargo, la capacidad de retención del gas y k_{LA} alcanzan la estabilidad (Ramírez Mérida et al. 2013). Ciertos tipos de mezclado, con relación a la tensión de cizallamiento, puede ser la razón de la caída en la tasa de crecimiento específica. Además, el k_{LA} aumenta dentro de un rango de tamaño de burbuja en columnas de burbujeo y reactores airlift. Burbujas pequeñas (<2 mm diámetro) causan más daño celular que burbujas mayores (~10 mm diámetro) (Chisti y Jauregui-Haza, 2002). Por tanto, la mezcla, el tamaño de la burbuja, la velocidad superficial del gas y la presión de CO₂ deben ajustarse a los requerimientos de cada sistema de cultivo en específico.

3. Justificación

Como se mencionó anteriormente, el 80 % de la demanda mundial energética está basada en combustibles fósiles, se sabe que estos combustibles son una fuente de recursos no renovables y se estima que con un consumo moderado en 100 años se empezará a tener problemas de obtención de energía. El estudio de microalgas para la obtención de biocombustibles es una buena opción ofreciendo una fuente de energía alterna que a su vez no es tan agresiva con el medio ambiente.

La problemática actual del calentamiento global se debe a que los combustibles sueltan muchas emisiones de CO₂, con el cultivo de microalgas se quiere reducir el porcentaje de CO₂ que hay en el medio ambiente como principal fuente de carbono que a su vez produce los metabolitos necesarios para la fabricación de biocombustibles.

La microalga de estudio que se empleó fue *Chlorella protothecoides* UTEX 256 ya que este género es el más estudiado y se ha reportado con alta productividad de lípidos, su porcentaje en peso seco se encuentra entre 50.3-57.8%. El fotobiorreactor que se usará para los cultivos celulares será de tipo airlift. Se seleccionó este tipo de fotobiorreactor ya que presenta mejores resultados en crecimiento de biomasa, además, facilitan la transferencia de masa, y aceptan mayores tasas de aireación (Chisti y Jauregui-Haza, 2002). Cabe destacar que no se necesita de sistemas de agitación y tiene un menor gasto energético de entre los sistemas cerrados.

Los medios se utilizaron fueron el Bristol 3N que es el más usado para cultivo del género *Chlorella* y uno propuesto a base de fertilizante comercial (Bayfolan) de marca Bayer, el medio a base de fertilizante contiene vitamina B1 y ácido indolacético que es precursor del crecimiento, esto con el fin de hacer una comparativa de crecimiento microalgal utilizando estos dos medios.

4. Hipótesis

El carbono del CO₂, así como la presencia de nitrógeno y de fitohormonas proveniente de un fertilizante comercial (Bayfolan) en el medio de cultivo de microalgas en el fotobiorreactor tipo airlift permitirá incrementar los valores de productividad en biomasa microalgal así como en triacilglicéridos.

Así mismo, el flujo de aire que se suministre en el fotobiorreactor tipo airlift, ofrecerá un mejor mezclado de nutrientes con la biomasa.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Establecer las condiciones de cultivo de microalgas en fotobiorreactor airlift para incrementar la productividad en biomasa y de lípidos.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar las técnicas analíticas que permitan cuantificar la concentración de biomasa, nitrógeno elemental y lípidos totales en la biomasa; nitrógeno, en el medio de cultivo.
- Evaluar en fotobiorreactor enchaquetado, el efecto de los medios de cultivo Bristol 3N y Bayfolan en la cinética de crecimiento de *C. protothecoides* UTEX 256 a fin de seleccionar el medio de cultivo que presente mayor productividad en biomasa.
- Evaluar en fotobiorreactor tipo airlift (2,2 L) un flujo de aire adecuado para una buena suspensión celular de biomasa junto con los nutrientes durante el cultivo de *C. protothecoides*.

6. Materiales y métodos

6.1 Cepa y mantenimiento celular en medio sólido

En este trabajo se utilizó la cepa de *Chlorella protothecoides* UTEX 256 proveniente de la Colección de Cultivos de la Universidad de Texas, Austin, EUA. Dicha cepa se encuentra disponible en la Planta Piloto 4 de Fermentación en Medio Sólido.

Para el mantenimiento de cepa se usó medio proteosa peptona sólido en cajas de Petri. La composición en g L⁻¹ del medio es la siguiente: NaNO₃, 0.25; CaCl₂·2H₂O, 0.025; MgSO₄·7H₂O, 0.075; K₂HPO₄, 0.075; KH₂PO₄, 0.175; NaCl, 0.025; proteosa peptona (BD Difco), 1; agar microbiológico, 15. El pH de este medio es de 6.8 ± 0.3, los cultivos se mantuvieron a 26 °C con ciclos de luz/oscuridad (L/O) de 10/14 horas respectivamente a una intensidad de luz de 900 ± 100 lx.

6.2 Propagación de *Chlorella protothecoides* en medio líquido

Las réplicas se realizaron en tubos de ensaye y el inóculo se obtuvo a partir de las cajas Petri, se cultivaron en medio líquido Bristol 3N cuya composición en g L⁻¹ es la siguiente: NaNO₃, 0.75; CaCl₂·2H₂O, 0.025; MgSO₄·7H₂O, 0.075; K₂HPO₄, 0.075; KH₂PO₄, 0.175; NaCl, 0.025 y solución metálica P-IV (6 mL L⁻¹), con un pH de 6.2 ± 0.3 a 26 °C, L/O = 10/14 h y con intensidad de luz de 900 ± 100 lx. La composición de la solución metálica PIV en unidades de g L⁻¹ es la siguiente: Na₂EDTA·2H₂O, 0.75; FeCl₃·6H₂O, 0.097; MnCl₂·4H₂O, 0.041; ZnCl₂, 0.005; CoCl₂·6H₂O, 0.002; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.004.

6.3 Preparación de precultivos

En la preparación de los precultivos se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio Britol 3N y con un medio a base de fertilizante Bayfolan a una concentración de 0.66 g L⁻¹, se inocularon a partir de las réplicas de tubos de ensayo con un porcentaje de inóculo del 20-30 %, se realizaron réplicas cada 3 semanas para asegurar que se tenga suficiente inóculo para ser utilizado en los sistemas de cultivo. La composición del fertilizante Bayfolan es (% p/p): N, 24.0; P₂O₅, 17.0; K₂O, 13.0; S, 0.20; Fe, 0.10; Zn, 0.10; Mn, 0.05; B, 0.04; Ca, 0.020; Mg, 0.025; Cu, 0.025; Co, 0.005; Mo, 0.0025; clorhidrato de tiamina (Vitamina B1), 0.0040 y ácido indolacético, 0.0030.

6.4 Determinación de biomasa por gravimetría-espectrofotometría en medio Bristol 3N

Para realizar la curva estándar se determinó la correlación entre la densidad óptica de la muestra y el peso seco a diferentes diluciones. Se hicieron 15 diluciones por triplicado en un rango de 0 a 25 mL de una suspensión celular de *C. protothecoides* (0.1517 g L^{-1}) cultivado en medio Bristol 3N, de los cuales se usaron 20 mL para peso seco. En la Tabla 2 se puede observar las diluciones correspondientes. A cada dilución se midió la densidad óptica a 750 nm (DO_{750}) en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-VIS 180. Se utilizó papel de microfibra de vidrio GF/F ($0.7 \mu\text{m}$) para filtrar las diluciones, previamente puesto a peso constante en una estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez filtrada la muestra, se pesó para calcular la concentración de biomasa (g L^{-1}).

Tabla 2. Diluciones realizadas para la determinación de la curva estándar.

Dilución	Suspensión celular (mL)	Medio de cultivo (mL)
1	0	25
2	1	24
3	2	23
4	4	21
5	6	19
6	8	17
7	10	15
8	12	13
9	14	11
10	16	9
11	18	7
12	20	5
13	22	3
14	24	1
15	25	0

En la Figura 6 se muestra la curva estándar promedio de biomasa (g L^{-1} vs. DO), su ecuación calculada es $y = 3.0222 x - 0,033$, donde: “x” es la concentración de biomasa (g L^{-1}) y “y” es DO_{750} , con un valor $R^2 = 0.9857$.

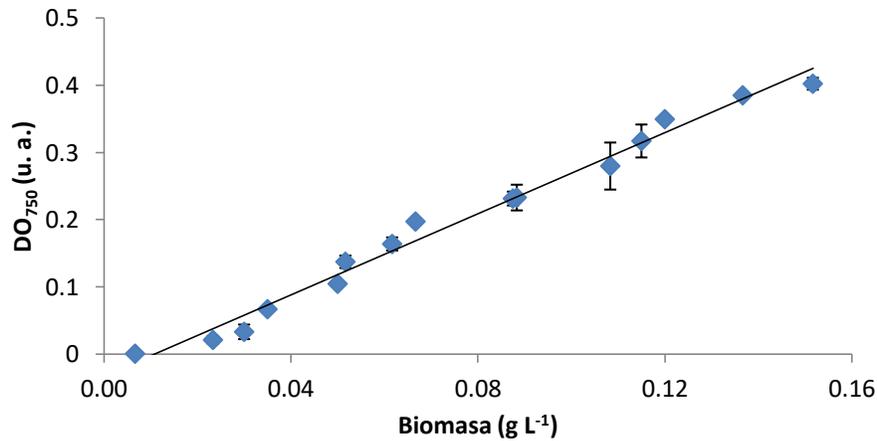


Figura 6. Curva estándar de biomasa g L⁻¹ vs. DO₇₅₀.

6.5 Determinación de biomasa por conteo de células-espectrofotometría en medio Bristol 3N

De las diluciones se tomaron 5 mL para hacer una correlación de densidad óptica vs. número de células mL⁻¹ con la finalidad de hacer la curva estándar. Se utilizaron los valores de DO₇₅₀ obtenidos del punto anterior. De cada 5 mL se tomó una alícuota para realizar el conteo de células usando una Cámara de Neubauer. En la Figura 7 se muestra los cuadros utilizados para la realización del conteo.

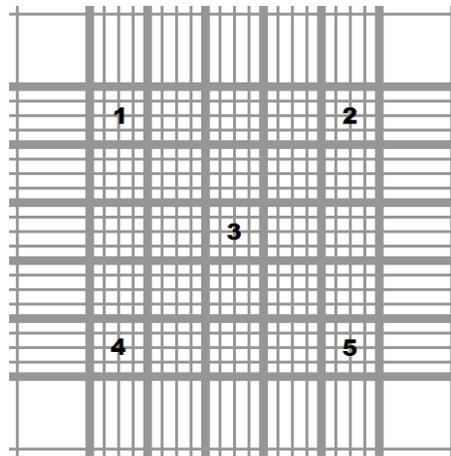


Figura 7. Cuadrantes utilizados para el conteo de células.

Para calcular el número de células mL⁻¹ se promedió el conteo de los 5 cuadros, después se multiplico por el total de los cuadros que hay en la cámara (25) y al final se multiplica por el factor 10⁴, en dado caso de que se haya hecho dilución para realizar el conteo multiplicar el valor final por el factor de dilución. La curva estándar promedio por conteo de células (número de células mL⁻¹ vs.

DO₇₅₀) se presenta en la Figura 8 con una ecuación de $Y = 8E-08 X + 0.0249$, donde: “x” es número de células mL⁻¹ y “y” es DO₇₅₀; presenta una $R^2 = 0.9861$.

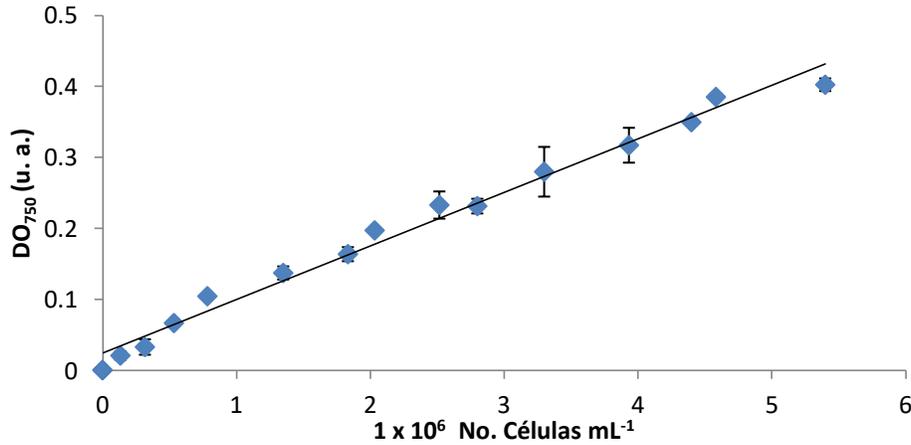


Figura 8. Curva estándar de No. Células mL⁻¹ vs. DO₇₅₀.

6.6 Determinación de biomasa por conteo de células-espectrofotometría en medio Bayfolan

La determinación de la curva estándar de la correlación de número células vs. DO₇₅₀, se realizó un conteo de células de muestras diluidas provenientes de un precultivo de *C. protothecoides* en medio Bayfolan con una Cámara de Neubauer, en la Tabla 3 se muestran las diluciones que se llevaron a cabo por triplicado. El valor de número de células mL⁻¹ se hizo de la forma descrita anteriormente.

Tabla 3. Diluciones realizadas para la determinación de la curva estándar.

Dilución	Suspensión celular (mL)	Medio de cultivo (mL)
1	0	10
2	1	9
3	2	8
4	3	7
5	4	6
6	5	5
7	6	4
8	7	3
9	8	2
10	9	1

Para cada dilución se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-VIS 1800 a 750 nm. En la Figura 9 se observa la gráfica de la curva estándar cuya ecuación es: $Y = 7E-08 X + 0.0904$, donde: “x” es el número de células mL⁻¹ y “y” es DO₇₅₀; con $R^2 = 0.9564$.

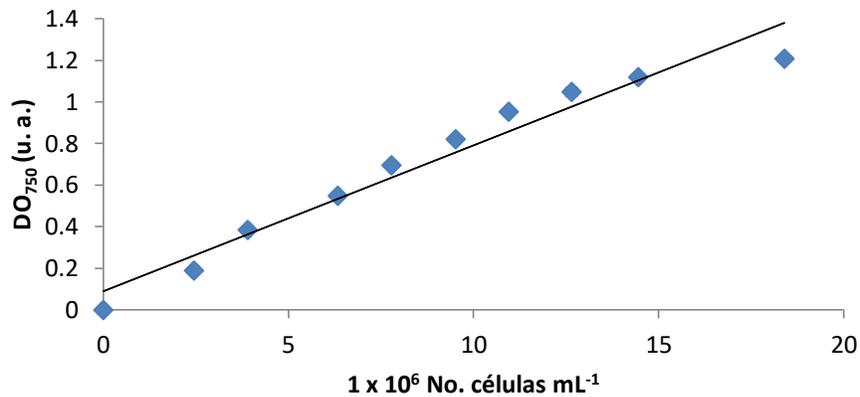


Figura 9. Curva estándar de número de células mL⁻¹ vs. DO a 750 nm.

6.7 Determinación de Carbono y Nitrógeno elemental en la biomasa

Basado en el método clásico de Pregl-Dumas, las muestras se queman en un ambiente de oxígeno puro, los gases de combustión resultantes son medidos de manera automatizada. El análisis elemental considera la determinación de uno o más elementos químicos en una muestra. La muestra puede ser un compuesto o una mezcla de especies químicas, prácticamente todos los materiales orgánicos que contengan carbono, hidrógeno y nitrógeno.

El analizador Perkin Elmer series II CHNS/O utiliza un método de combustión para convertir los elementos de las muestras en gases (CO₂, H₂O y N₂). La muestra primero es oxidada en una atmósfera de oxígeno puro usando catalizadores clásicos. Los productos producidos en esta zona de combustión incluyen CO₂, H₂O y N₂ (Figura 10). Elementos como halógenos y el azufre, son removidos por los reactivos inferiores en la zona de combustión. Los gases resultantes son homogenizados y sometidos a las mismas condiciones de presión temperatura y volumen. Posteriormente son sometidos a una despresurización a través de una columna donde son separados de una manera secuencial en estado estacionario y detectados en función de su conductividad térmica.

El sistema usa señales en un estado estable para una primera aproximación cromatográfica al separar los gases. Esta aproximación involucra separar una mezcla continua de gases a través de una columna cromatográfica. Mientras que los gases se eluyen, cada gas se separa por pasos en estado estacionario, con cada subsecuente adición de gas. Consecuentemente, cada paso se convierte en la referencia para una señal subsecuente.

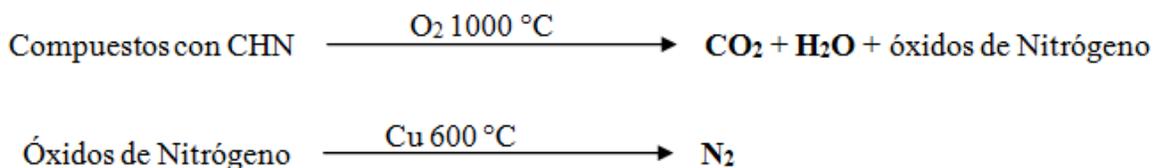


Figura 10. Reacción de combustión realizada por el analizador CHN.

La biomasa por analizar se obtiene a partir de una liofilización de cultivo de *C. protothecoides* en la etapa estacionaria de su cinética de crecimiento. De la muestra se pesan 2 mg, que se colocan en un vehículo de estaño; se introduce el vehículo en el analizador Perkin Elmer series II CHNS/O, usando como blanco aire y para la calibración del equipo acetilnida con un composición elemental de: 71.09 % C; 6.71 % H y 10.36 % N.

6.8 Determinación de la concentración de nitrógeno como nitrato en el medio de cultivo.

En la determinación de nitrógeno en forma de nitrato (N-NO_3^-) en el medio de cultivo se realizó un barrido espectrofotométrico para determinar la longitud de onda en donde los nitratos tienen su máximo de absorción. En la Figura 11 se muestra el barrido espectrofotométrico realizado por triplicado con una dilución de medio 1:100.

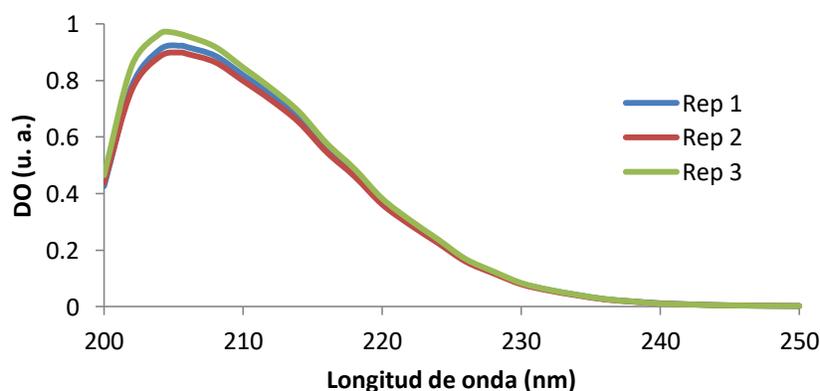


Figura 11. Barrido espectrofotométrico de N-NO_3^- por triplicado del medio con dilución 1:100.

El barrido espectrofotométrico determinó que la longitud de onda para medir nitratos es de 205 nm ya que se consiguió alcanzar una densidad óptica máxima cercana 1. Para el medio Bristol 3N se calculó que hay 123.6 mg L^{-1} de nitrógeno en forma de nitrato (N-NO_3^-).

Así mismo, se determinó la curva estándar de concentración de nitrógeno vs. DO medida a 205 nm (DO₂₀₅). Las mediciones de DO se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25. Se hicieron 10 diluciones por triplicado a partir de una solución madre (SM) de 1.5 mg L⁻¹ de NaNO₃, en la Tabla 4 se muestran las diluciones correspondientes.

Tabla 4. Diluciones a partir de la solución madre (SM) para la determinación de la curva estándar.

Volumen de SM (μL)	Volumen de HCl (mL)	Volumen de Agua (mL)	Volumen de Agua (μL)	Volumen total (mL)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
0	17	83	0	100	0.00
50	17	82	950	100	0.05
100	17	82	900	100	0.10
200	17	82	800	100	0.20
400	17	82	600	100	0.40
600	17	82	400	100	0.60
800	17	82	200	100	0.80
1000	17	82	0	100	1.00
1200	17	81	800	100	1.20
1400	17	81	600	100	1.40
1500	17	81	500	100	1.50

Como se muestra en la Tabla 4 a las muestras se les agregó 17 mL de ácido clorhídrico 1 M con el fin de estabilizar los nitratos y evitar interferencias al momento de medir la DO₂₀₅. En la Figura 12 se muestra la curva estándar de N-NO₃⁻ vs. DO₂₀₅, la ecuación de la recta es: $y = 0.6444 x + 0.0204$; donde: “x” es la concentración de N-NO₃⁻ en mg L⁻¹ y “y” es la DO₂₀₅, con una R² = 0.9984.

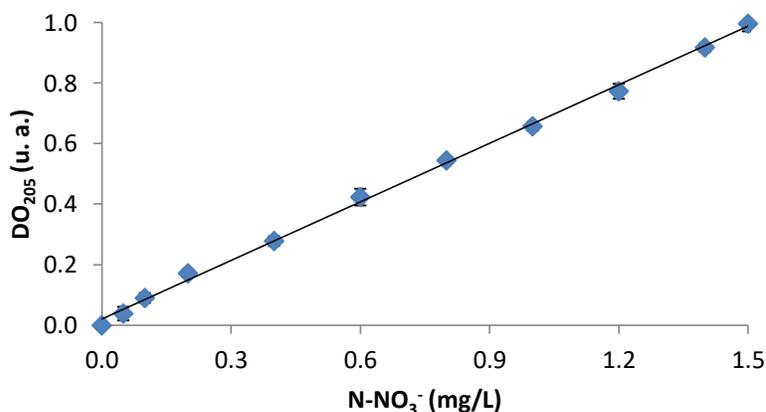


Figura 12. Curva estándar de N-NO₃⁻ vs. DO₂₀₅.

6.9 Determinación de lípidos totales en biomasa por el método de Folch

El método de Folch es una técnica que se usa para la determinación de lípidos en grasas animales (Folch et al. 1957); sin embargo, este método se ha utilizado en la extracción de lípidos en microalgas (Axelsson y Gentili. 2014). Este método consiste en extraer los lípidos mediante una mezcla de solventes para separar la fase orgánica en donde se encuentran lípidos de la fase inorgánica, a continuación se explican los pasos que se siguieron para extraer los lípidos totales con esta técnica:

- **Preparación de la biomasa:** La biomasa se liofilizó, se pulverizó en un mortero y se secó en una estufa a 60 °C por 24 h, por último, se pesó la muestra y se tomó nota del peso.
- **Metodología:** En función del peso de la muestra se agrega una mezcla 2:1 cloroformo/metanol (v:v) en una relación 20:1 (v:p) respecto al peso de la biomasa (ejemplo: a 1 g de biomasa se le agrega 20 mL de la mezcla de disolvente). Después se mezcló en un tubo Falcon durante 20 minutos en un vortex. La muestra se centrifugó a 6000 rpm, una vez divididas las fases se recuperó la fase orgánica (cloroformo). Se realiza un lavado con solución fisiológica (NaCl 0.9%) en una proporción 1:5 (v:v) respecto a la fase orgánica (ejemplo: 4 mL de fase orgánica y 20 mL de solución salina); se centrifuga de nuevo a 2000 rpm durante 10 min; por último, se conserva la fase orgánica. Se dejó evaporar el cloroformo y se mantuvo el extracto de lípidos en frasco ámbar que se guarda en un lugar seco y fresco.
- **Determinación del porcentaje de lípidos totales:** Para calcular el porcentaje de lípidos totales en base húmeda (%_{Lh}), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%_{Lh} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$\%_{Lh}$ = porcentaje de lípidos totales en base húmeda

m = peso de la muestra

m_1 = peso del matraz vacío

m_2 = peso del matraz con lípidos.

Para calcular el porcentaje de lípidos totales en base seca ($\%_{Ls}$):

$$\%_{Ls} = \%_{Lh} \times \frac{100}{100 - \%_h} \quad (2)$$

Donde:

$\%_{Ls}$ = porcentaje de lípidos totales en base seca

$\%_h$ = porcentaje de humedad de la muestra.

Los resultados se expresan en porcentaje de materia grasa en base seca o húmeda. Se recomienda hacer el análisis por triplicado, promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con 2 decimales.

Repetibilidad: La diferencia de los 2 resultados no debe ser superior al 2 % del promedio.

6.10 Determinación de productividad de biomasa, de lipídica y fijación de CO₂ en la microalga

Para calcular el valor de productividad de biomasa (P_X), de lípidos (P_L) y la fijación de CO₂ se usaron las ecuaciones reportadas por Binnal y colaboradores (2017):

$$P_X = \frac{X_{max} - X_0}{n} \quad (3)$$

Donde:

P_X = Productividad de biomasa (g L⁻¹ d⁻¹)

X_{max} = La concentración máxima de biomasa (g L⁻¹)

X_0 = La concentración de biomasa al inicio (g L⁻¹)

n = el tiempo de cultivo (d)

$$P_L = P_X * \%_L * 100 \quad (4)$$

Donde:

P_L = Productividad de lípidos (g L⁻¹ d⁻¹)

P_X = Productividad de biomasa (g L⁻¹ d⁻¹)

$\%_L$ = Porcentaje de lípidos totales

$$R_C = C_c * P_X * \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (5)$$

Donde:

R_C = La estimación de la fijación de CO₂

C_c = El porcentaje de carbono elemental de biomasa microalgal

P_X = Productividad de biomasa (g L⁻¹ d⁻¹)

M_C = Peso molecular del carbono (g mol⁻¹)

M_{CO_2} = Peso molecular de CO₂ (g mol⁻¹)

6.11 Descripción de los sistemas de cultivo

En esta sección se describirán los sistemas de cultivo que se usaron en el cultivo de *C. protothecoides*, se utilizaron tres tipos de fotobiorreactores: cilíndrico de 1L, enchaquetado de 0.5 L y un tipo airlift de 2.2 L cada uno en tres sistemas de cultivos diferentes.

6.11.1 Sistema de cultivo con fotobiorreactor cilíndrico

El fotobiorreactor cilíndrico comprende 3 partes importantes: 1. Sistema de aireación que consiste en una bomba aire mezclado con CO₂, equipado con un humidificador; 2. Sistema de iluminación con lámparas de luz LED que está a lado del fotobiorreactor y; 3. Fotobiorreactor cilíndrico. En la Figura 13 se muestra el diagrama del sistema.

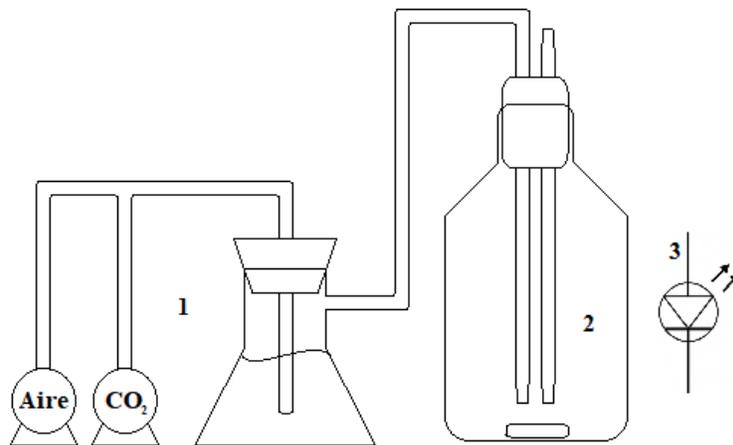


Figura 13. Diagrama del sistema de cultivo; componentes: 1. Sistema de aireación, 2. Fotobiorreactor cilíndrico de 1 L y, 3. Sistema de iluminación LED.

En la Figura 14 se muestra un diagrama del fotobiorreactor cilíndrico, está conformado por una botella de 1 L, que contiene un tapón de algodón para la purga de aire, en el tapón se encuentran el puerto de aireación y de muestreo y, un agitador magnético.

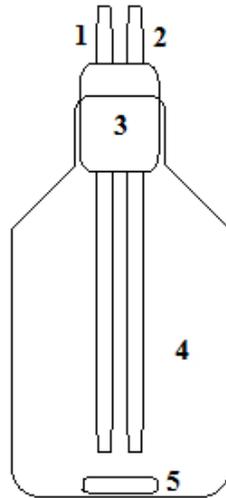


Figura 14. Diagrama de fotobiorreactor cilíndrico; componentes: 1. Puerto de aireación, 2. Puerto de muestreo, 3. Tapón de algodón (purga), 4. Botella de 1 L, 5. Agitador magnético.

6.11.2 Sistema de cultivo con fotobiorreactor enchaquetado

El fotobiorreactor enchaquetado contiene 5 partes importantes: 1. Sistema de aireación que consiste en una bomba de aire, equipado con un humidificador; 2. Sistema de iluminación formado por una tira de luz LED enroscada alrededor del fotobiorreactor; 3. Sistema de control de temperatura el cual consiste en un baño de agua a temperatura controlada mediante un termostato y una bomba de agua conectada a la chaqueta del fotobiorreactor; 4. El fotobiorreactor enchaquetado de 0.5 L y; 5. Sistema de agitación que comprende una parrilla con agitador magnético. En la Figura 15 se muestra el diagrama del sistema.

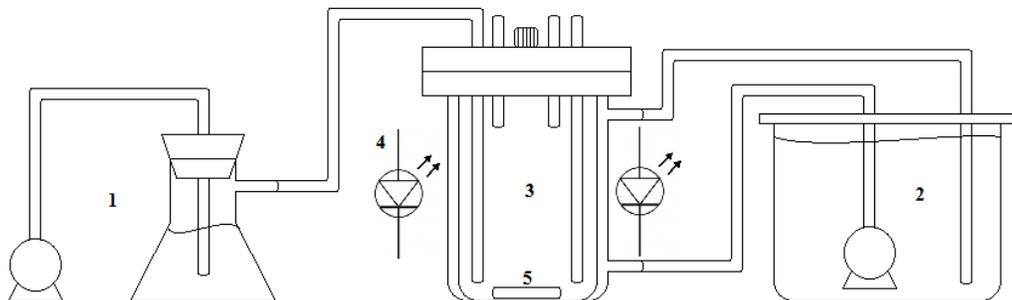


Figura 15. Diagrama del sistema de cultivo donde: 1. Sistema de aireación, 2. Sistema de control de temperatura, 3. Fotobiorreactor enchaquetado 4. Sistema de iluminación y, 5. Sistema de agitación.

En la Figura 16 se muestra un diagrama del fotobiorreactor, está equipado con una chaqueta con sus respectivos puertos de entrada y salida, en la tapa tiene el puerto de entrada de aire, dos puertos de purga y el puerto de muestreo, también tiene un puerto de alimentación de nutrientes.

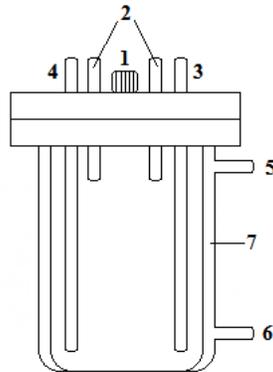


Figura 16. Diagrama de fotobiorreactor enchaquetado, componentes: 1. Puerto de alimentación; 2. Puertos de purga; 3. Puerto de muestreo; 4 Puerto de aireación; 5. Puerto de salida de chaqueta; 6. Puerto de entrada de chaqueta; 7. Chaqueta.

6.11.3. Sistema de cultivo con fotobiorreactor tipo airlift

El sistema de cultivo tiene 4 partes importantes: 1. Sistema de aireación que consiste en una bomba de aire, con su respectivo humidificador; 2. Sistema de iluminación que está formado por una tira de luz LED enroscada alrededor del fotobiorreactor; 3. Sistema de control de temperatura el cual consiste en un baño de agua a temperatura controlada mediante un termostato y una bomba de agua conectada a la chaqueta del fotobiorreactor y; 4. El fotobiorreactor airlift. En la Figura 17 se muestra el diagrama del sistema.

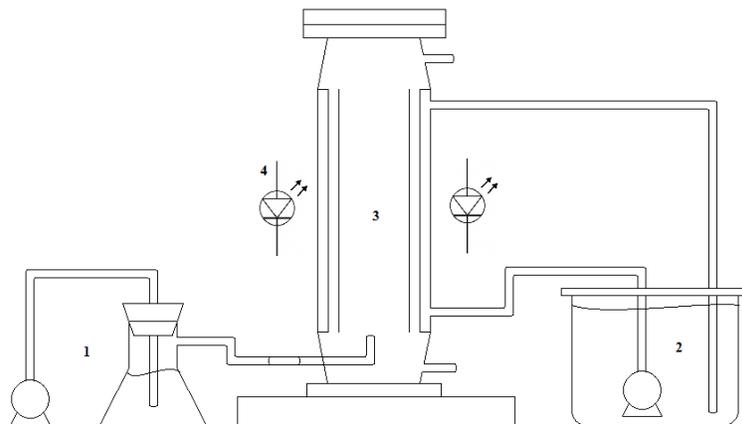


Figura 17. Diagrama del sistema de cultivo donde: 1. Sistema de aireación, 2. Sistema de control de temperatura, 3. Fotobiorreactor airlift y, 4. Sistema de iluminación.

En la Figura 18 se muestra el diagrama del fotobiorreactor airlift. El fotobiorreactor está conformado de un tubo concéntrico; una chaqueta con sus puertos de entrada y salida; un puerto de purga de aire en la parte arriba y otro de entrada de aire en la parte inferior que se utilizó como puerto de muestreo.

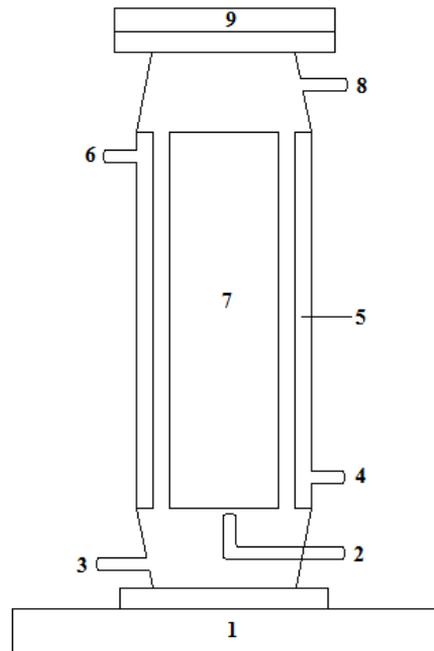


Figura 18. Diagrama de fotobiorreactor airlift, componentes: 1. Base, 2. Puerto de aireación, 3. Puerto de muestreo, 4. Puerto de entrada de chaqueta, 5. Chaqueta, 6. Puerto de salida de chaqueta, 7. Tubo concéntrico, 8. Puerto de purga, 9. Tapa de media luna.

6.11.4 Caracterización geométrica del fotobiorreactor tipo airlift

En la Figura 19 se puede observar las dimensiones de fotobiorreactor tipo airlift utilizado en este estudio. Las dimensiones que se tomaron en cuenta para su diseño son: la longitud del volumen de operación (L_1), la longitud del tubo concéntrico (L_2), el diámetro del fotobiorreactor (D_1), el diámetro del tubo concéntrico, la altura del fondo hasta el tubo concéntrico (fondo) y en la parte superior de donde se encuentra el líquido separado de fases (separador)

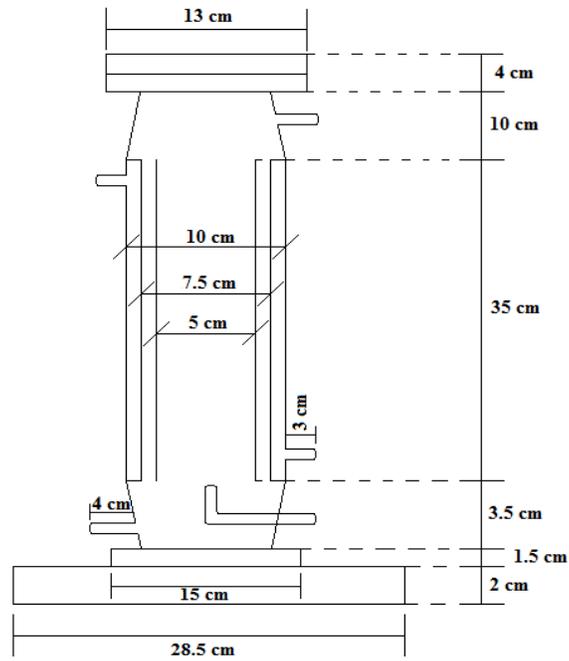


Figura 19. Dimensiones del fotobiorreactor airlift.

En la Figura 20 se puede apreciar con más detenimiento los parámetros L1, L2, D1, D2, fondo y separador. Lo reportado en anteriores investigaciones (Lizardi, 2011) las relaciones: $L2/L1$ está entre 0.6 a 0.9; $L2/L1$ es de 0.61 a 0.64; fondo/ $L1$ de 0.04 a 0.09 y, separador/ $L1$ de 0.06 a 0.22.

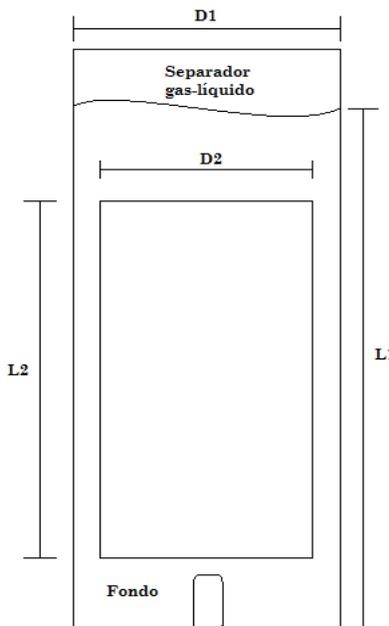


Figura 20. Diagrama de las dimensiones que se toman en cuenta en la geometría del airlift.

Las relaciones para el fotobiorreactor tipo airlift que se está operando son: L2/L1 es de 0.76, D2/D1 de 0.66, fondo/L1 0.10 y, separador/L1 de 0.13. Estos valores están dentro de lo reportado en estudios previos (Lizardi, 2011).

6.11.5 Determinación de k_{La} (CO_2) y balance de materia de CO_2 en condiciones bióticas.

La estimación de k_{La} (CO_2) se realizó mediante control y monitoreo en línea del flujo de salida del fotobiorreactor airlift del CO_2 , para esto se utilizó un sistema de respirometría con número de patente MX/a/2013/004638. Se trabajó a un volumen de operación de 2.1 L en el fotobiorreactor tipo airlift. Se emplearon flujos de 100, 500, 1000 mL min^{-1} , con una proporción de mezcla de aire/ CO_2 de 95/5 (v/v), respectivamente.

El sistema de respirometría o respirómetro (Torres Mancera, 2013) comprende de los siguientes elementos: válvulas solenoides, medidor de flujo, detector de CO_2 , detector de O_2 , controlador lógico programable (PLC) y un Datalogger M6+.

El respirómetro está constituido de 15 válvulas solenoides que permiten analizar la composición del aire en igual número de corrientes de aire seco que se pueden abrir y cerrar dependiendo de la configuración del PLC, el medidor de flujo permite analizar el flujo de aire seco a valores de 0 a 300 mL min^{-1} , el detector de CO_2 es un detector infrarrojo que permite cuantificar las concentraciones de gas de 0 a 30% v/v en la corriente gaseosa, el detector de O_2 es un detector dispersivo que permite cuantificar concentraciones de gas de 0 a 25% v/v en la corriente gaseosa, el PLC es el dispositivo que controla el sistema de válvulas a partir de secuencias ya construidas controlando el ciclo de abierto-cerrado de válvulas; por último, el Datalogger es un dispositivo que captura, transmite y traduce los datos de las variables medidas por los detectores de CO_2 y O_2 y del medidor de flujo.

Para calibrar el respirómetro se emplean dos mezclas de gases a flujo y concentraciones de CO_2 diferentes, el primer flujo fue de solamente aire a 50 mL min^{-1} con porcentaje de CO_2 de 0.04; el segundo flujo se midió a 100 mL min^{-1} . Se usó una mezcla de gases de aire/ CO_2 de 95:5 (v:v) Esto se hace con la finalidad de crear un intervalo tanto de flujos como concentraciones de CO_2 como marco de referencia para el procesamiento y captura de datos.

En la Figura 21 se muestra un esquema del sistema experimental para la medición de CO_2 , que cuenta con el fotobiorreactor airlift de 2.2 L que empleo agua destilada como fase líquida a un volumen de operación de 2.1 L, una columna sílica para secar aire proveniente del fotobiorreactor, una bomba de

aire para extraer una porción del flujo a la salida del sistema a 100 mL min^{-1} y, el respirómetro con número de patente MX/a/2013/004638.

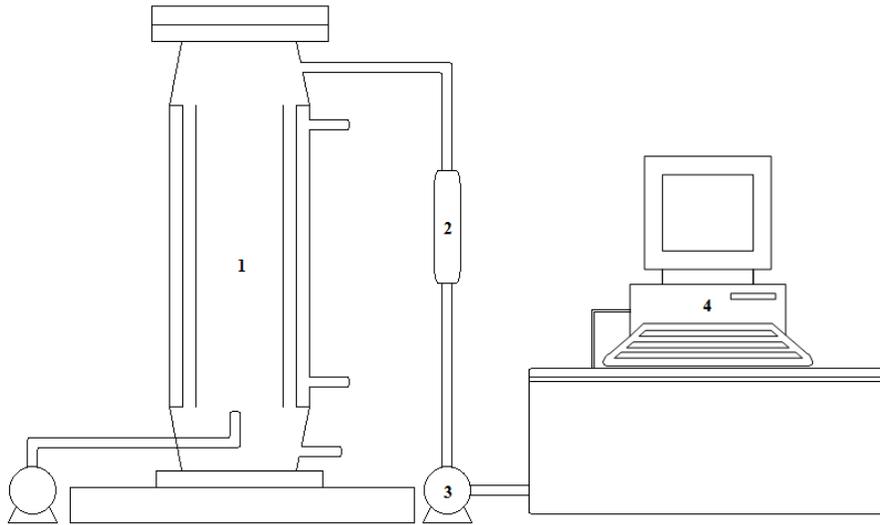


Figura 21. Esquema del sistema experimental: 1. Fotobiorreactor airlift, 2. Columna de sílica, 3. Bomba de aire, 4. Respirómetro (MX/a/2013/004638).

Con los datos del flujo de salida se pudo calcular el $k_{L,a}(\text{CO}_2)$, se realizaron balances de materia de CO_2 . El cálculo para la estimación se hizo en base a la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = k_{L,a}(C^* - C) \quad (6)$$

Donde:

$k_{L,a}$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

C^* = Concentración del CO_2 en el equilibrio o en fase estacionaria en el líquido.

C = Concentración del CO_2 en la el seno del líquido.

Como el cálculo de $k_{L,a}(\text{CO}_2)$ se realizó de manera dinámica a la ecuación anterior se le realizó una integración de una concentración C_1 a un tiempo t_1 a otra concentración C_2 con tiempo t_2 , de esta manera obtenemos:

$$\text{Ln} \left(\frac{C^* - C_1}{C^* - C_2} \right) = k_{L,a}(t_2 - t_1) \quad (7)$$

Con esta ecuación se realizó un gráfico con los datos experimentales para así obtener el valor de la pendiente que a su vez es el valor del $k_L a$ (CO_2).

Los cálculos referentes al balance de materia de CO_2 se realizaron con el porcentaje del flujo de CO_2 en la entrada y el valor del porcentaje de flujo de salida del fotobiorreactor tipo airlift en estado estacionario. La ecuación de balance está dada de la siguiente manera:

$$E + P = S + A \quad (8)$$

Donde:

E = Cantidad de materia que entra el sistema

P = Producción de materia que se genera dentro del sistema

A = Acumulación de materia que se genera dentro del sistema

S = Cantidad de materia que sale del sistema.

El sistema al que se refiere es al fotobiorreactor tipo airlift y la metería de estudio para este caso es el CO_2 . Con la cantidad de CO_2 que se acumula se puede hacer una estimación de cuanta biomasa se genera ya que por cada 1.8 g de CO_2 se produce 1 g de biomasa microalgal (Pires et. al., 2017, Elrayies, 2018).

7. Resultados y discusión

7.1 Evaluación del crecimiento de *Chlorella Protothecoides* en medio de cultivo Bristol 3N

Se evaluó el crecimiento de *C. protothecoides* en medio Bristol 3N. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura 26 ± 2 °C; periodos de 16 h de luz LED blanca (400 ± 20 lux) y 8 h de oscuridad; con suministro de una corriente gaseosa de aire y CO₂ de 95 y 5 mL/min, con un volumen de cultivo de 0.8 L (20 % de inóculo). Esto se realizó en un fotobiorreactor cilíndrico de 1 L. La Figura 22 muestra el sistema de cultivo para el crecimiento de *C. protothecoides*.



Figura 22. Sistema de cultivo para el crecimiento de *C. protothecoides* en fotobiorreactor cilíndrico a 26 ± 2 °C, 400 ± 20 lux, L/O: 16/8, flujo 100 mL min^{-1} (95% aire, 5% CO₂).

La Figura 23 presenta la curva de crecimiento de *C. protothecoides* y la evolución del pH. La concentración X_0 de 0.048 g L^{-1} . La fase exponencial inició a los 8.8 días con una concentración de biomasa (X) de 0.05 g L^{-1} , la fase estacionaria se alcanzó a las 20.8 días a una de 0.315 g L^{-1} . El cultivo fue monitoreado durante 26 días se obtuvo un valor de X_{max} de 0.338 g L^{-1} .

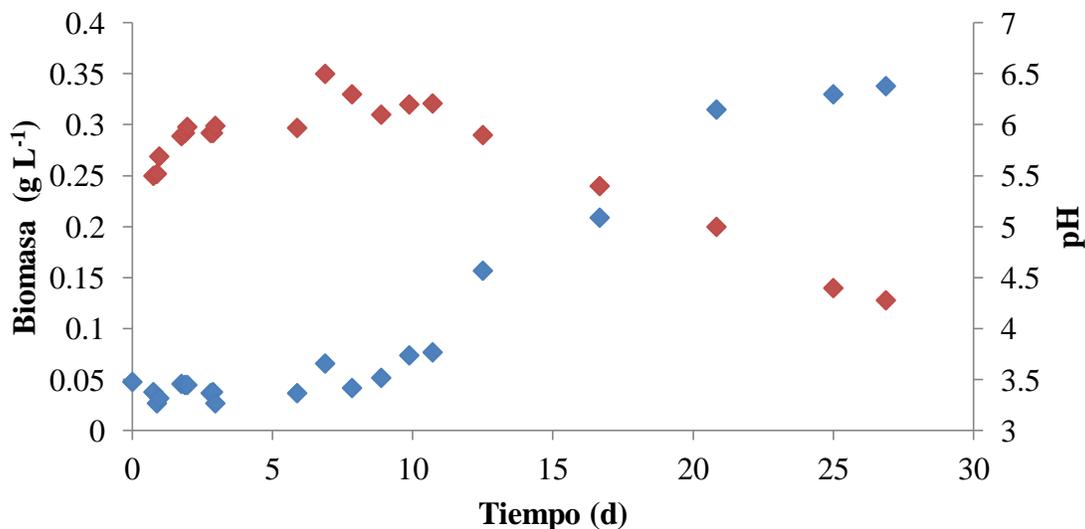


Figura 23. Curva de crecimiento de *C. protothecoides*, biomasa (g L⁻¹) (♦) y evolución del pH (♦) en medio Bristol 3N.

El pH inicial del cultivo fue de 5.5 y aumentó a 6.5 a los 6.9 días. Al final de la fase exponencial, el pH disminuyó a 5, mientras que al final del cultivo alcanzó un valor de 4.2. Esto podría deberse a la formación de ácido carbónico a partir del CO₂ (Cheng et al. 2013). Se ha reportado que para cultivos de *C. protothecoides* UTEX 256, en medio Proteosa (1 g L⁻¹) y flujo de aire de 1 L/min (5 % de CO₂ v/v), se alcanza una (X_{max} de 0.8 g/L y pH ~5.6 después de 11 días de cultivo. Este resultado representa el doble del valor obtenido en este trabajo (0.338 g L⁻¹). Esto puede deberse a que los flujos de aire y CO₂ son 10 veces más altos que los utilizados en este trabajo con *C. protothecoides* UTEX 256. Además, la proteosa peptona pudo haber favorecido el crecimiento debido a que éste es un hidrolizado de proteína.

Se puede concluir que *C. protothecoides* puede crecer en un medio formulado como lo fue con Bristol 3N; sin embargo, con compuestos adicionales puede subir el crecimiento microalgal, tales como fuentes de carbono de origen orgánico o con la adición de fitohormonas.

7.2 Evaluación de crecimiento de *Chlorella protothecoides* con medio de cultivo Bristol 3N y Bayfolan. Evolución de la fuente de nitrógeno.

Se evaluó el crecimiento de *C. protothecoides* en dos medios de cultivo, uno de ellos contiene ácido indolacético en su formulación. Además, se observó el consumo de nitrógeno durante el crecimiento microalgal. *C. protothecoides* se cultivó en dos fotobiorreactores enchaquetados de 0.5 L, uno de los fotobiorreactores con medio Bristol 3N y el otro con medio a base de un fertilizante comercial (Bayfolan). El cultivo se realizó por lote alimentado iniciando con un volumen de 0.2 L, alimentando 0.1 L de medio cultivo en ambos reactores a determinados lapsos de tiempo: 138 h, 353 h y 520 h. Las condiciones para ambos fotobiorreactores fueron las siguientes: temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, periodos de 12 h de luz LED blanca (841-832 lux) y 12 h de oscuridad y suministro de flujo de aire de 150 mL min^{-1} . En la Figura 24 se muestra una foto del sistema utilizado.



Figura 24. Foto del sistema utilizado para el cultivo de *C. protothecoides* a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 841-832 lux, L/O: 12/12, flujo de aire de 150 mL min^{-1} .

En medio Bristol 3N, durante la cinética de crecimiento el pH se mantuvo constante con un valor de 6.7 ± 0.2 , se determinó una concentración de X_{max} de 4.08×10^6 células mL^{-1} a una X_{max} en biomasa de 0.127 g L^{-1} . En la Figura 25 se muestra la cinética de crecimiento de *C. protothecoides* en medio Bristol 3N.

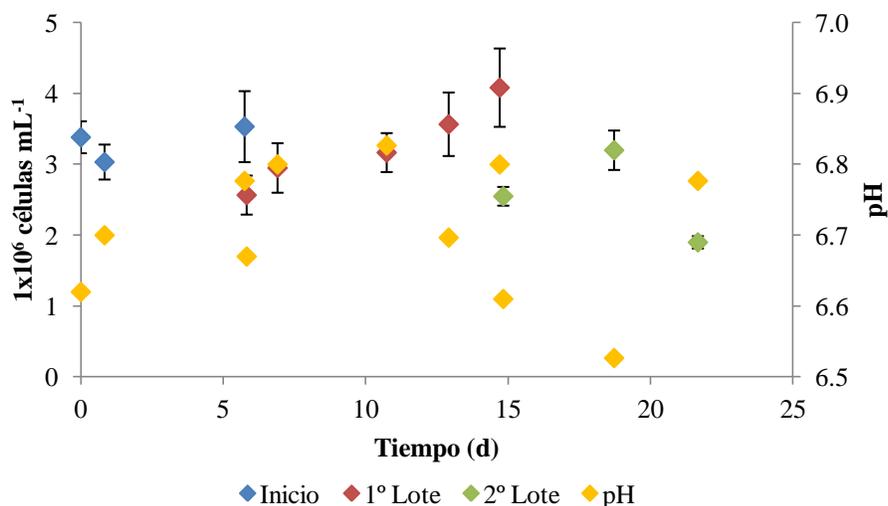


Figura 25. Cultivo de *C. protothecoides* en medio Bristol 3N y evolución del pH.

En el medio Bayfolan se determinó una X_{\max} de 14.0×10^6 células mL^{-1} y una X_{\max} en biomasa de 0.390 g L^{-1} . El pH inició en 6.74 y aumentó durante la cinética hasta llegar 8.4 al final del cultivo. En la Figura 26 se muestra la cinética de crecimiento de *C. protothecoides* en medio Bayfolan.

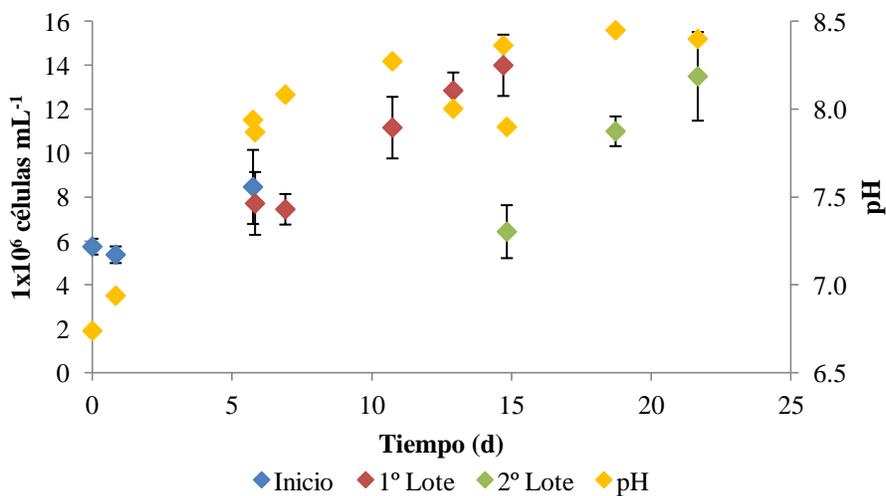


Figura 26. Cultivo de *C. protothecoides* en medio Bayfolan y evolución del pH.

El consumo de nitrógeno en forma de nitrato con el medio Bristol 3N fue mínimo, se observó una acumulación del mismo en el medio. En el medio Bayfolan si hay disminución en la concentración de nitrógeno, al inicio del cultivo fue de 86.23 mg L^{-1} y al final del cultivo de 71.25 mg L^{-1} . En la Figura 27 se puede apreciar la evolución del consumo de nitrógeno en los dos medios de cultivo.

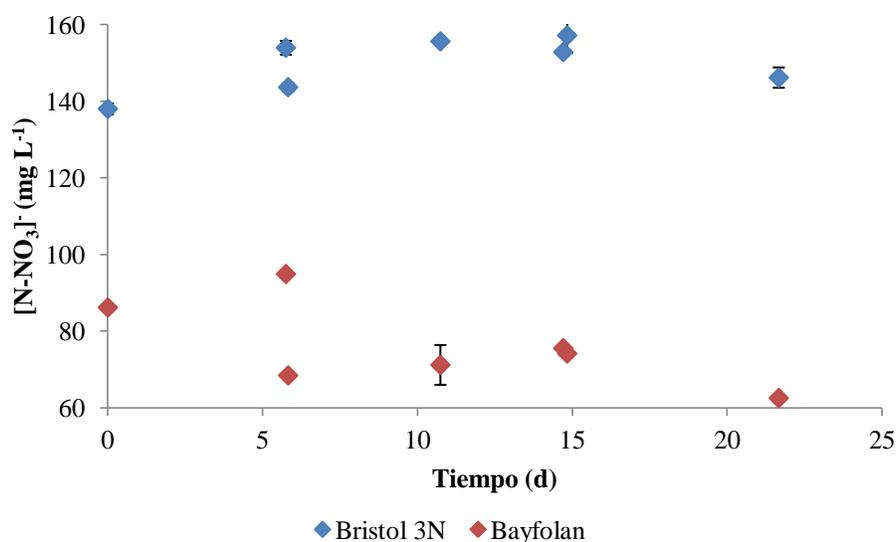


Figura 27. Evolución del consumo de nitratos en la cinética de *C. protothecoides* en los dos medios.

El aumento del pH en el medio Bayfolan es debido a que en medida que la biomasa va aumentando el pH también aumenta. (Tan et al. 2017). Dado que casi siempre las referencias bibliográficas se dan los resultados en unidades de $g L^{-1}$ en la Tabla 5 se muestra los datos de biomasa, de número de células y concentración de nitratos en el medio de cultivo obtenidos durante la cinética de crecimiento de *C. protothecoides* para los dos medios de cultivos utilizados en el experimento.

Tabla 5. Datos de biomasa, de número de células y concentración de nitratos en el medio de cultivo obtenidos durante la cinética de crecimiento de *C. protothecoides*.

Tiempo (h)	Bristol 3N			Bayfolan (FC)		
	Biomasa $g L^{-1}$	No. Cél. mL^{-1} (1E+06)	N en NO_3^- $mg L^{-1}$	Biomasa $g L^{-1}$	No. Cél. mL^{-1} (1E+06)	N en NO_3^- $mg L^{-1}$
0.0	0.109	3.383	138.056	0.171	5.750	86.235
20.0	0.100	3.033	----	0.162	5.383	----
138.0	0.113	3.533	154.004	0.243	8.47	94.967
Primera alimentación						
139.8	0.087	2.567	143.694	0.223	7.717	68.508
165.8	0.097	2.950	----	0.216	7.450	----
257.8	0.103	3.167	155.680	0.315	11.167	71.255
310.0	0.114	3.567	----	0.359	12.850	----
353.0	0.127	4.083	152.871	0.390	14.000	75.605
Segunda alimentación						
356.0	0.087	2.550	157.211	0.190	6.433	74.229
449.42	0.104	3.200	----	0.310	11.000	----
520.0	0.070	1.900	146.219	0.377	13.500	62.611

Se puede observar para el caso del medio Bristol 3N una X_0 de 0.109 g L^{-1} y X_{\max} de 0.127 g L^{-1} . Para el medio Bayfolan la biomasa inició en 0.171 g L^{-1} y una X_{\max} 0.390 g L^{-1} . Wang y colaboradores (Wang (2016) obtuvieron una biomasa 3.97 g L^{-1} para *C. protothecoides*, mayor a lo reportado en este trabajo, estas diferencias pueden ser por la alimentación de una mezcla de gases enriquecida con CO_2 y el uso de glucosa como fuente de carbono adicional (Wang, et al 2016); sin embargo, no se agregó una fuente de carbono adicional porque se quería ver el comportamiento de *C. protothecoides* utilizando como fuente de carbono el CO_2 proveniente del aire.

La concentración de nitrógeno en el medio puede afectar el crecimiento microalgal, ya que a concentraciones altas de nitrógeno, disminuye el crecimiento y a su vez a bajas concentraciones de nitrógeno aumenta la productividad de lípidos (Binnal et al. 2017, Chen et al. 2017); esto puede ser la causa del porque se obtuvieron concentraciones de biomasa bajas de *C. protothecoides* en el medio Bristol 3N, debido a la acumulación excesiva de nitrato de sodio por la alimentación de nutrientes. Sin embargo, la causa principal del crecimiento en medio Bayfolan es la presencia de ácido indolacético en su formulación, siendo esta una fitohormona que estimula el crecimiento en *C. protothecoides*. Se ha demostrado que el uso de fitohormonas en condiciones de concentración de nitrógeno baja aumenta la concentración de biomasa (Yu et al. 2018).

El uso de fitohormonas en *C. protothecoides* aumentó considerablemente X_{\max} , ya que con medio Bristol se obtuvo un valor de 0.127 g L^{-1} y con el fertilizante Bayfolan se tuvo un valor de 0.390 g L^{-1} un valor poco más que el doble que con el medio Bristol 3N. Conociendo la composición de carbono y nitrógeno en la biomasa microalgal se podría verificar cuánto carbono fue absorbido durante el crecimiento de *C. protothecoides*.

7.3 Productividad de biomasa, fijación de CO₂ y contenido de nitrógeno elemental de *Chlorella protothecoides*

Se determinó el porcentaje de carbono y nitrógeno de *C. protothecoides* con el fin de calcular la Productividad de biomasa (P_X), la fijación de CO₂ (R_C) y el porcentaje de nitrógeno elemental durante la cinética de crecimiento, que se realizaron en los fotobiorreactores de 0,5 L, para esto la biomasa fue liofilizada y las muestras fueron analizadas en un Analizador Perkin Elmer Series II CHNS/O. En la Tabla 6 se muestran los porcentajes de C y N elemental de *C. protothecoides* cultivado en los dos medios de cultivo.

Tabla 6. Composición elemental de C y N de *C. protothecoides* cultivada en medio Bristol 3N y Bayfolan.

<i>Chlorella protothecoides</i> UTEX 256			
Medio de cultivo	C (%)	N (%)	C/N
Bristol 3N	34.30	5.08	6.76
Bayfolan	28.26	8.81	3.21

En el Anexo A se encuentran los cálculos correspondientes para la obtención de la productividad de biomasa (P_X) y fijación de CO₂ (R_C). En la Tabla 7 se engloba los valores de P_X y R_C de *C. protothecoides* cultivado tanto en medio Bristol 3N y Bayfolan.

Tabla 7. Productividad de biomasa (P_X) y fijación de CO₂ (R_C) de *C. protothecoides* que se cultivó en medio Bristol 3N y Bayfolan.

<i>Chlorella protothecoides</i> UTEX 256		
Medio de cultivo	P_X (g L ⁻¹ d ⁻¹)	R_C (g L ⁻¹ d ⁻¹)
Bristol 3N	0.0046	0.5785
Bayfolan	0.0189	1.9584

Se obtuvo una mejor productividad de biomasa con el medio a base del fertilizante Bayfolan con un valor de 0.0189 g L⁻¹ d⁻¹, reportados con la literatura tenemos que para un fotobiorreactor tipo airlift de 1.4 L usando *Chlorella sp.* usando medio TAP se reportó una productividad de biomasa de 0.268 g L⁻¹ d⁻¹ (Ghosh et al. 2017). Este valor es alto ya que el medio que se usó tiene acetato como principal fuente de carbono. En lo que respecta a la fijación del CO₂ se obtuvo un valor de 1.9584 g L⁻¹ d⁻¹, un valor alto comparado con el registrado por Binnal y colaboradores (2017) que fue de 0.2861 g L⁻¹ d⁻¹.

¹ d⁻¹. La fijación de CO₂ fue beneficiada gracias a que en el medio a base del fertilizante Bayfolan tiene uno de sus componentes el ácido indolacético que es una fitohormona que estimula el crecimiento microalgal dando como resultado una mejor fijación de CO₂.

También hubo una mejor fijación de nitrógeno elemental ya que el porcentaje de nitrógeno elemental en la biomasa cultivada en medio Bayfolan fue de 8.81%, mucho mejor que la cultivada en medio Bristol 3N (5.08%). Comparando estos resultados con el consumo de nitrógeno (Tabla 5), *C. protothecoides* tuvo una mejor asimilación de la fuente de nitrógeno en el medio Bayfolan, esto se puede apreciar por la fracción de nitrógeno en la biomasa cultivada con este medio.

Estos resultados muestran que el uso de un medio a base del fertilizante Bayfolan es mejor que el uso de un medio formulado ya que dio rendimientos de productividad de biomasa de 0.0189 g L⁻¹ d⁻¹, y hubo una fijación de CO₂ de 1.9584 g L⁻¹ d⁻¹, valores mayores respecto a los obtenidos con el medio Bristol 3N.

Una vez obtenido la productividad de biomasa de *C. protothecoides* cultivada en medio Bayfolan es de suma importancia saber los lípidos totales, así como su productividad lipídica con el fin de comparar estos valores con los obtenidos en reportes de la literatura.

7.4 Productividad de lípidos en *Chlorella protothecoides* durante el cultivo en medio Bayfolan

Se estimó la concentración de lípidos totales en *C. protothecoides* cultivada con el medio Bayfolan así como también la productividad lípidos, con la finalidad de comparar estos valores con la literatura. La biomasa se obtuvo a partir de un ensayo anterior, esta fue liofilizada, se utilizó el método de Folch que consiste en extracción de lípidos a partir de solventes. En la Figura 28 se muestra claramente la separación de la fase orgánica de la inorgánica

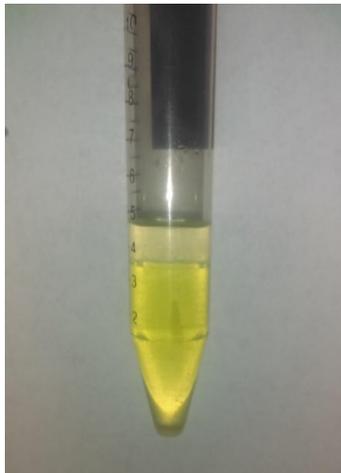


Figura 28. Separación de la fase orgánica (lípidos) de la inorgánica a partir de biomasa seca liofilizada de *C. protothecoides*.

En el Anexo B se indican los cálculos realizados para obtener los valores de porcentaje de lípidos totales ($\%_L$) y productividad de lípidos (P_L). El valor de $\%_L$ de *C. protothecoides* cultivados en medio Bayfolan fue de 2.27%, un porcentaje bajo ya que se han reportado porcentajes de lípidos de 28.7% (Wang et al. 2016) con flujo de aire usando glucosa como fuente de carbono en un fotobiorreactor de tanque agitado. La posible explicación de que se obtuvo un valor de 2.27% es debido al tipo de fuente de carbono utilizada hay que recalcar que el aire tiene un porcentaje de carbono del 0.039% y el medio a base del fertilizante comercial Bayfolan que se usó para el cultivo carecía de fuente de carbono, hay que recordar que se quería observar el comportamiento del crecimiento de *C. protothecoides* suministrando solamente aire.

El valor de P_L reportado por Wang (Wang et al. 2016) es de $4.2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, esto comparado con el valor que se obtuvo de $4.29 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, son prácticamente iguales, esto plantea que no depende el tipo de fuente de carbono ya sea orgánica e inorgánica se pueden llegar obtener valores parecidos; sin

embargo, el valor de P_L calculado puede ser mayor si se le suministra un flujo con un mayor porcentaje de CO_2 .

Los valores de lípidos totales obtenidos son muy bajos con respecto a los reportados en estudios previos ya que se determinó un valor de 2.27% de lípidos totales; por otra parte, la productividad lipídica no se vio afectada ya que el resultado de $4.2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ es similar al encontrado en la bibliografía.

El medio de cultivo Bayfolan para el cultivo *C. protothecoides* tuvo los mejores resultados en cuanto a concentración de biomasa, productividad de biomasa y fijación de CO_2 ; por lo que, el medio Bayfolan se usará para cultivar *C. protothecoides* en el fotobiorreactor tipo airlift; sin embargo, antes de utilizar el fotobiorreactor tipo airlift se debe buscar un flujo apropiado para que el mezclado sea el más idóneo. En este sentido, esto permitiría, determinar el $k_{La} (CO_2)$ y los balances del CO_2 para obtener una estimación de la producción de biomasa.

7.5 Estimación de k_{La} en fotobiorreactor airlift en condiciones abióticas.

Se evaluó el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) del CO_2 para determinar el flujo de gas mediante el cual se mantiene la concentración de CO_2 en el equilibrio en las dos fases (líquido/gas). Se realizaron mediciones a tres flujos: 100, 500 y 1000 $mL\ min^{-1}$, cada flujo fue alimentado mediante una mezcla de gases de aire y CO_2 puro con una proporción de 5% de CO_2 y 95% de aire el cual fue inyectado en el fotobiorreactor airlift. Las mediciones se realizaron mediante un sistema de respirometría descrito en materiales y métodos. Se utilizaron tres válvulas de las cuales la primera se le inyectó un flujo de aire a $50\ mL\ min^{-1}$, la segunda una mezcla de aire/ CO_2 a $100\ mL\ min^{-1}$ y la tercera estaba conectada al flujo de salida del fotobiorreactor tipo airlift, las dos primeras válvulas se usaron solamente para revisar la calibración del respirómetro. Se tomaron muestra cada minuto y medio hasta que la concentración del CO_2 llegará al equilibrio. En la Figura 29 se muestran la evolución del porcentaje de la concentración de CO_2 a la salida del sistema con respecto al tiempo para los tres flujos que se inyectaron en el fotobiorreactor tipo airlift.

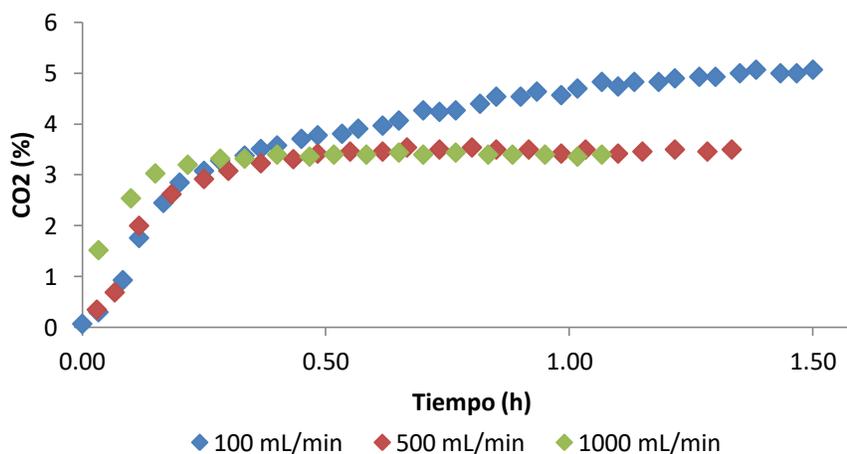


Figura 29. Evolución de CO_2 (%) con respecto al tiempo a tres flujos: 100, 500 y 1000 $mL\ min^{-1}$.

Se observa que con el flujo a $100\ mL\ min^{-1}$ no se pudo llegar a una concentración de equilibrio esto es debido a que el flujo era tan bajo que no se pudo establecer un equilibrio en las dos fases (líquido/gas) esto quiere decir que el porcentaje que entraba de CO_2 al fotobiorreactor tipo airlift era la misma que el de la salida esto llevo a que no había una fuerza de mezclado lo suficientemente fuerte como para mantener el equilibrio entre la fase líquido y la de gas.

Sustituyendo los valores proyectados en la Figura 30 en la ecuación 7 que tienden a una línea recta se puede determinar el k_{La} para los flujos de 500/1000 $mL\ min^{-1}$. En la Figura 31 se presenta el gráfico de los logaritmos naturales de la concentración de CO_2 para el flujo de 500 $mL\ min^{-1}$.

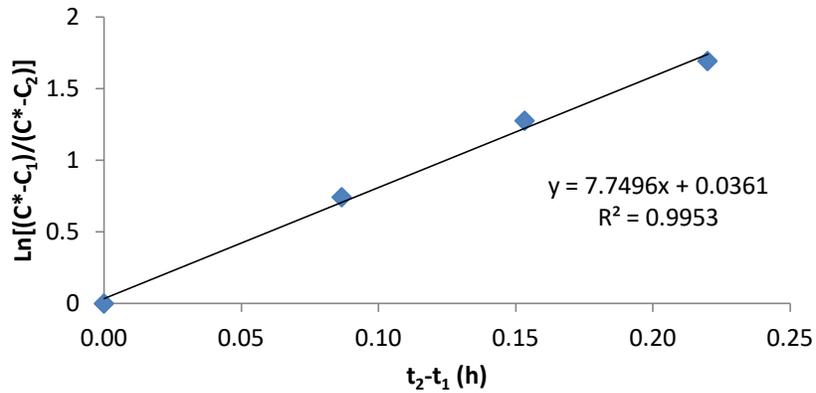


Figura 30. Gráfica para el cálculo de k_{LaCO_2} con flujo de 500 mL min^{-1} .

De igual forma en la Figura 31 se muestra el gráfico con los logaritmos naturales de la concentración de CO_2 para el flujo de 1000 mL min^{-1} .

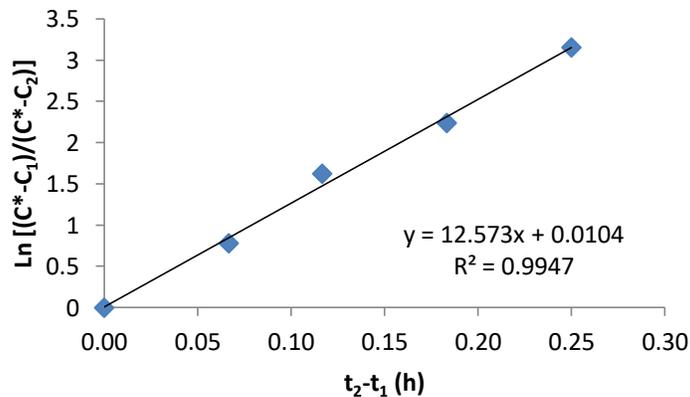


Figura 31. Gráfica para el cálculo de k_{LaCO_2} con flujo de 1000 mL min^{-1} .

El k_{La} del CO_2 a un flujo de 500 mL min^{-1} es igual a 7.74 h^{-1} , mientras que el de 1000 mL min^{-1} es de 12.57 h^{-1} , y los dos valores con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.99. Como se puede observar el k_{La} del CO_2 es directamente proporcional al flujo, esto muestra que el flujo de la mezcla de gases suministrado ofrece un mejor mezclado para la homogenización de CO_2 que es una fuente principal de carbono para las microalgas.

En trabajos similares (Kazim 2012) en reactores de tanque agitado se ha obtenido valores de k_{La} (CO_2) de 10.8 h^{-1} a flujos de 1000 L min^{-1} con una agitación de 400 rpm a condiciones abióticas. Se puede apreciar que el k_{La} del CO_2 que se determinó en el fotobiorreactor tipo airlift con flujo de 1000 mL min^{-1} es mayor (12.57 h^{-1}). Esto sugiere que usar un fotobiorreactor tipo airlift para el cultivo de

microalgas es posible ya que su mezclado permite una mejor absorción de CO_2 proviene de la fase gas a la fase líquida.

En condiciones bióticas se han reportado valores de $k_{\text{LA}} (\text{CO}_2)$ para fotobiorreactores de tipo columna burbuja y airlift de 52.8 h^{-1} y 51.9 h^{-1} respectivamente, usando *Chlorella sorokiniana* obteniendo valores de X_{max} de 3.1 g L^{-1} para el fotobiorreactor de columna burbuja y 4.44 g L^{-1} para el de tipo airlift (Kumar et al. 2012). Con estos datos se espera que los valores de k_{LA} en el fotobiorreactor tipo airlift con el que se está trabajando sean mayores en condiciones bióticas.

Los resultados indican que a partir de flujos de aire o mezcla de gases a 500 mL min^{-1} o más son idóneos para ser usados en el fotobiorreactor airlift. El $k_{\text{LA}} (\text{CO}_2)$ es mayor conforme el flujo sea mayor dentro del fotobiorreactor tipo airlift ya que a un flujo de una mezcla de gases aire/ CO_2 (95/5 %) de 1000 mL min^{-1} se obtuvo un valor de $k_{\text{LA}} (\text{CO}_2)$ de 12.57 h^{-1}

7.6 Balance de CO_2 en fotobiorreactor airlift en condiciones abióticas.

Se realizó un balance de materia para determinar la cantidad de CO_2 que queda dentro del sistema de cultivo del fotobiorreactor tipo airlift con la finalidad de estimar la productividad de biomasa que podría tener *C. protothecoides*. Con las condiciones del subtema anterior y con los resultados obtenidos en la Figura 30 se pudo determinar el porcentaje de CO_2 a la salida del sistema en estado estacionario el cual fue de 3.5% a un flujo de 500 mL min^{-1} y de 3.4% en el flujo de 1000 mL min^{-1} .

En la Figura 32 se muestra el diagrama del balance de sistema del fotobiorreactor airlift a un flujo de 500 mL min^{-1} , mostrando los valores de los flujos de entrada y salida (F_E , F_S); también, los flujos correspondientes a CO_2 y aire de entrada (E_{CO_2} , E_a) y de salida (S_{CO_2} , S_a).

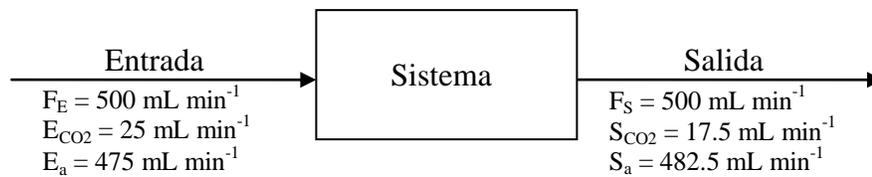


Figura 32. Diagrama del balance del fotobiorreactor airlift a un flujo de 500 mL min^{-1} .

Para el flujo de 1000 mL min^{-1} se hizo de la misma forma un balance de sistema en el fotobiorreactor airlift, en la Figura 33 se muestra el diagrama del balance del sistema a un flujo de 1000 mL min^{-1} mostrando los valores de los flujos de entrada y salida (F_E , F_S); también, los flujos correspondientes a CO_2 y aire de entrada (E_{CO_2} , E_a) y de salida (S_{CO_2} , S_a) con porcentaje de CO_2 a la salida del sistema de 3.4%.

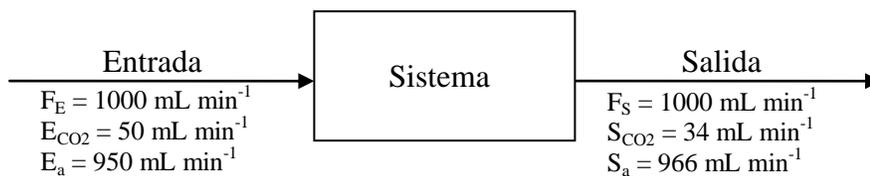


Figura 33. Diagrama del balance del fotobiorreactor airlift a un flujo de 1000 mL min⁻¹.

Se realizaron cálculos para estimar los valores que se pueden obtener de productividad de biomasa que podría generarse en el fotobiorreactor tipo airlift, estos cálculos se pueden ver en el Anexo C, los cuales, los resultados fueron: P_X de 5.612 gX L⁻¹ d⁻¹ para el flujo de 500 mL min⁻¹ y 11.973 gX L⁻¹ d⁻¹ en el caso de flujo de 1000 mL min⁻¹.

Se ha reportado en la literatura un valor de P_X de 0.268 g L⁻¹d⁻¹ con *Chlorella sp.* (Ghosh et al. 2017). Comparando este valor con las productividades a 500 mL min⁻¹ (5.612 g L⁻¹ d⁻¹) y de 1000 mL min (11.973 g L⁻¹ d⁻¹) estos valores son muy altos; sin embargo, observando la Tabla 1 podemos ver que P_X en condiciones heterótrofas se puede alcanzar un valor de 7.3 g L⁻¹ d⁻¹ para *C. protothecoides*.

Cabe aclarar que, aunque se obtuvieron valores de P_X altos en condiciones abióticas hay otros factores que se tienen que tomar en cuenta como la fijación del CO₂ de la microalga, los nutrientes, temperatura entre otras para alcanzar valores de productividad estimados en condiciones abióticas de 5.612 g X L⁻¹ d⁻¹ para el flujo de 500 mL min⁻¹ y 11.973 gX L⁻¹ d⁻¹ en el caso de flujo de 1000 mL min⁻¹.

7.7 Pruebas de mezclado de *Chlorella protothecoides* en fotobiorreactor airlift

Se realizaron pruebas de mezclado en condiciones bióticas usando *C. protothecoides* en fotobiorreactor tipo airlift de 2.2 L con el objetivo de determinar el flujo apropiado para la correcta homogenización de la microalga con el medio de cultivo. El sistema de cultivo esta descrito en el materiales y métodos, con una proporción de inóculo inicial del 50 % proveniente de precultivos a 26 °C, intensidad de luz de 1000 ± 100 lx y L/O de 10/14 h., usando medio Bayfolan, se probaron tres flujos de aire: 500, 800 y 1400 mL min^{-1} estos valores de flujo de aire se definieron de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos. En la Figura 34 se muestra una foto del sistema.

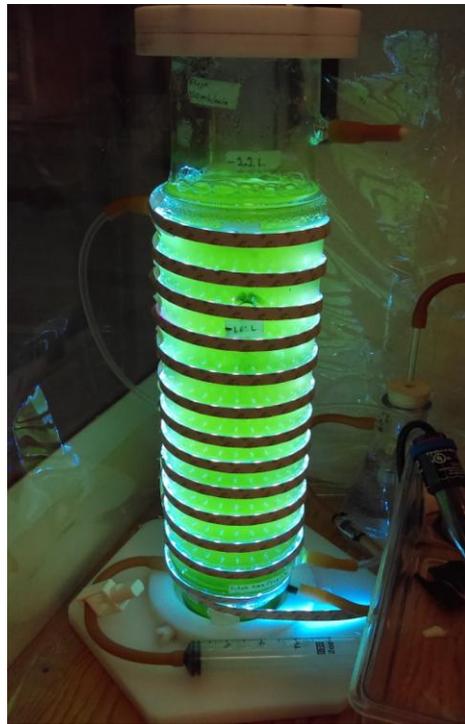


Figura 34. Sistema de cultivo de *C. protothecoides* en el fotobiorreactor tipo airlift a 26 ± 2 °C, 1000 ± 100 lx, L/O: 10/14 h, y flujo de 500, 800 y 1400 mL min^{-1} .

La Figura 35 muestra la evolución del cultivo de *C. protothecoides* a un flujo de 500 mL min^{-1} con una concentración inicial (X_0) de 5.1×10^6 células mL^{-1} y una concentración final (X_F) de 3.02×10^6 células mL^{-1} cultivado durante 7.82 d, el pH del cultivo durante todo el tiempo fue de 6.88 ± 0.04 .

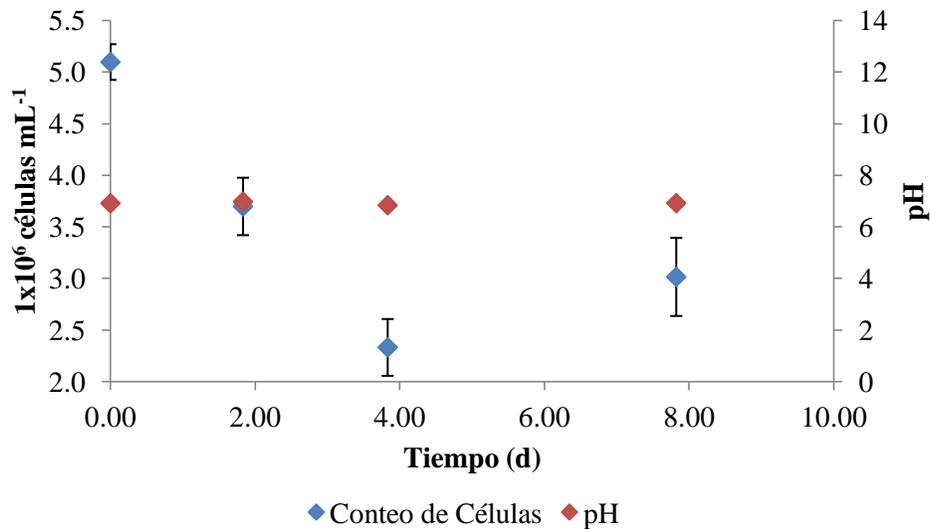


Figura 35. Evolución de pH y *C. protothecoides* en fotobiorreactor tipo airlift a flujo de 500 ml min⁻¹.

En la Figura 36 se presenta la evolución de *C. protothecoides* a un flujo de 800 mL min⁻¹, con X_0 de 4.17×10^6 células mL⁻¹ y una X_F de 2.87×10^6 células mL⁻¹ con un tiempo de cultivo de 5.88 d. El pH durante todo el proceso fue de 7.26 ± 0.09 .

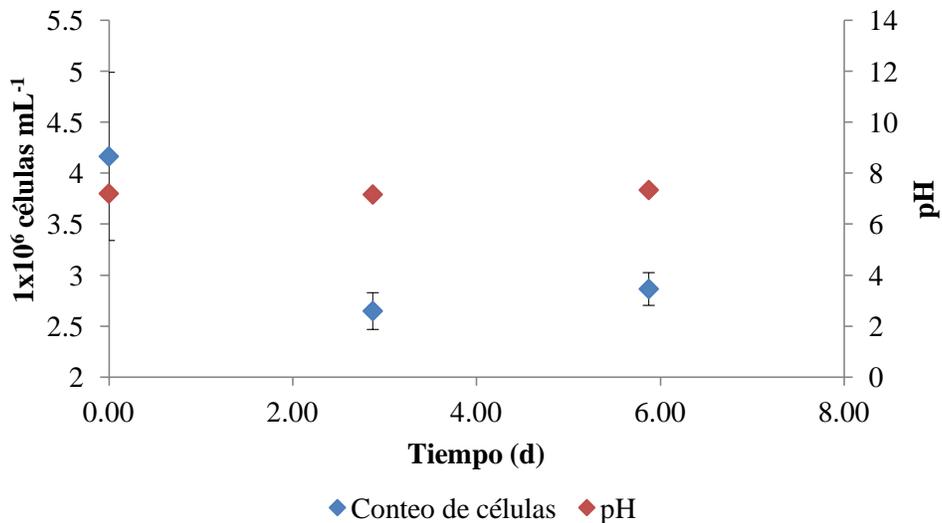


Figura 36. Evolución de *C. protothecoides* en fotobiorreactor tipo airlift a flujo de 800 ml min⁻¹ y evolución de pH.

En la Figura 37 se muestran los resultados del cultivo de *C. protothecoides* a un flujo de 1400 mL min⁻¹, en donde $X_0 = 1.6 \times 10^6$ células mL⁻¹, se llegó a una concentración de 3.1×10^6 células mL⁻¹ a las 3.1 d de cultivo y se obtuvo una $X_F = 1.9 \times 10^6$ células mL⁻¹. El pH durante toda la etapa fue de $7.42 \pm 0,29$

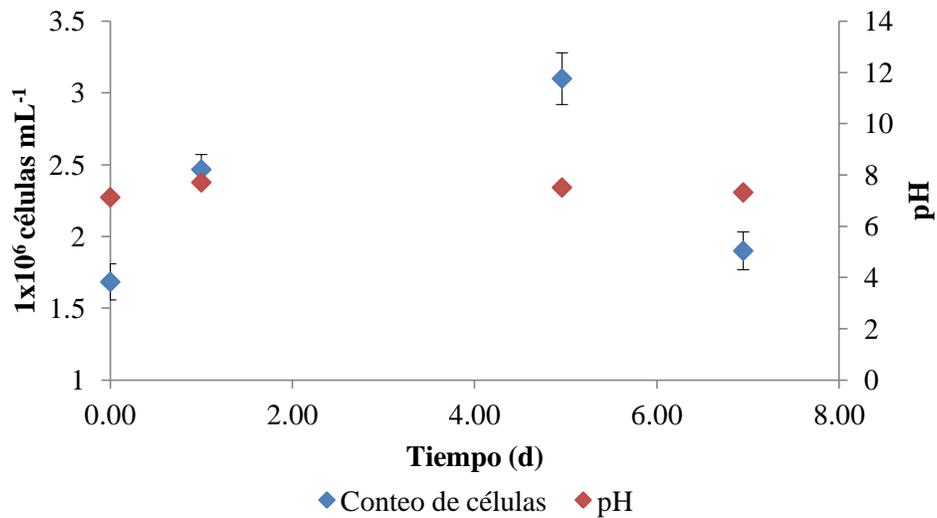


Figura 37. Evolución del pH y en número de células Cultivo de *C. protothecoides* en fotobiorreactor tipo airlift a flujo de 1400 ml min⁻¹ y evolución de pH

En la Tabla 8 se pueden apreciar los datos de concentración biomasa (X) y de número de células obtenidos en la evolución del cultivo de *C. protothecoides* en el fotobiorreactor tipo airlift. En los tres casos para los flujos se obtuvieron diferentes tiempos de cultivo debido a que se realizaron por separado por lo los cultivos se iniciaron con diferentes X₀ diferentes. Comparando estos resultados con la literatura Sun y colaboradores (Sun et al. 2015) reportan concentraciones de biomasa de *C. protothecoides* de de 4,4 g L⁻¹ en fotobiorreactor tipo columna burbuja con una mezcla de gases de aire/CO₂ de 98.5/1.5%, este valor es muy alto comparado con el valor en donde hubo un aumento en la biomasa que fue en el flujo de aire a 1400 mL min⁻¹ que fue de 0,1126 g L⁻¹. Esto se debe a que la cantidad de CO₂ suministrada en el reporte de Sun es más alta y presentó un mejor mezclado, el flujo que se usó en este experimento solo contenía aire y durante la medición de biomasa en los tres flujos se presentó precipitación de biomasa ocasionando un mal mezclado entre los nutrientes y la biomasa y los flujos propuestos fueron los que se usaron en la sección 7.5.

Tabla 8. Datos de concentración biomasa (X) y de número de células obtenidos en la evolución del cultivo de *C. protothecoides* en el fotobiorreactor tipo airlift.

500 mL min ⁻¹			800 mL min ⁻¹			1400 mL min ⁻¹		
Tiempo (d)	X (g L ⁻¹)	No. Cél. mL ⁻¹ (1E+06)	Tiempo (d)	X (g L ⁻¹)	No. Cél. mL ⁻¹ (1E+06)	Tiempo (d)	X (g L ⁻¹)	No. Cél. mL ⁻¹ (1E+06)
0.00	0.1590	5.10	0.00	0.1373	4.17	0.00	0.0798	1.68
1.83	0.1265	3.70	2.87	0.1022	2.65	1.00	0.0980	2.47
3.83	0.0949	2.33	5.88	0.1072	2.87	4.96	0.1126	3.10
7.82	0.1107	3.02	---	---	---	6.25	0.0848	1.90

Sin embargo, en la investigación realizada por Hosseini y colaboradores (2016) usaron flujos de 4 L min⁻¹ y 14 L min⁻¹ con *Scenedesmus dimorphus*, ellos obtuvieron mejores resultados con el primer flujo obteniendo un valor de biomasa de 1,01 g L⁻¹, por lo que, menores velocidades del flujo de gas condujeron a una mayor concentración de biomasa a medida que aumentaba el tiempo de transferencia de gas y líquido.

En base a los resultados se puede decir que a pesar de que no hubo un perfecto mezclado en los tres flujos flujos (500, 800 y 1400 mL min⁻¹), se pudo apreciar un leve crecimiento de biomasa a un flujo de 1400 mL min⁻¹ en donde comenzó con una concentración de biomasa de 0.0798 g L⁻¹ y aumento a 0.1126 g L⁻¹ a las 167 h de cultivo. Hay que aclarar que aumentando el flujo y la cantidad de CO₂ que se inyecta al fotobiorreactor tipo airlift podría incrementar el crecimiento de *C. protothecoides*.

8. Conclusiones

Se establecieron las técnicas analíticas para la cuantificación de la biomasa, la determinación de nitrógeno en medio y en biomasa. También, se determinaron procedimientos para el mantenimiento y elaboración de precultivos de microalgas.

El cultivo de *C. protothecoides* en los dos medios de cultivo propuestos (Bristol 3N y Bayfolan) mostró que el medio a base de Bayfolan es el mejor para usarlo en el fotobiorreactor tipo airlift, alcanzando una concentración de biomasa de 14.0×10^7 células mL⁻¹, con una productividad de biomasa de 0.0189 g L⁻¹ d⁻¹, una fijación de CO₂ de 1.9584 g L⁻¹ d⁻¹, productividad de 4.29 g L⁻¹ d⁻¹

El k_{La} del CO₂ en el fotobiorreactor tipo airlift alcanzó un valor de 12.57 h⁻¹ con un flujo de 1000 mL min⁻¹, con el cual podría obtenerse una P_X de 11.973 g L⁻¹ d⁻¹.

En las pruebas mezclado en condiciones bióticas en el fotobiorreactor tipo airlift los resultados no fueron lo esperado ya que a un flujo de aire de 1400 mL min⁻¹ no hubo la suficiente fuerza para que hubiera una suspensión de células en el medio llegando a una concentración de biomasa de 3.10×10^6 células mL⁻¹, sin embargo con un flujo apropiado, se podría llegar a un valor más alto que con los obtenidos con los fotobiorreactores enchaquetados.

9. Perspectivas

- Estudiar de manera más detallada el cultivo de microalgas para la obtención de precursores de Biodiesel.
- Buscar otros métodos para aumentar la concentración de biomasa aparte del medio de cultivo como por ejemplo cambiar los periodos de luz y oscuridad.
- Utilizar una mejor fuente de carbono ya sea de origen inorgánico como el CO₂ u orgánico como puede ser la glucosa.
- Hacer la determinar de la cantidad de triacilglicéridos producidos en biomasa de *C. protothecoides*
- Cultivar *C. protothecoides* en el fotobiorreactor airlift y hacer una comparativa con los cultivos en fotobiorreactores agitados

10. Referencias

1. Alam F., Mobin S., Chowdhury H. 2015. “*Third generation biofuel from Algae*”. *Procedia Engineering* 105: 763-768.
2. Al-Iwayzy S. H., Yusaf T., Al-Juboori R. A. 2014. “*Biofuels from the Fresh Water Microalgae Chlorella vulgaris (FWM-CV) for Diesel Engines*”. *Energies* 7: 1829-1851.
3. Axelsson M., Gentili F. 2014. “*A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae*”. *PLoS ONE* 9(2): e89643. doi:10.1371/journal.pone.0089643.
4. Baca B., Elmerich C. 2007. “*Microbial production of plants hormones by microorganisms*” In: *Associative Nitrogen-fixation Bacteria and Cyanobacteria. IV. 2007. Series: Nitrogen Fixation: Origins, Applications and Research Progress. Vol. 2007. Pp 113.137.*
5. Cassán F., Sgroy V., Perrig D., Masciarelli O., Luna V. 2008. “*Producción de fitohormonas por Azospirillum sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal En: Azospirillum sp.*” En: *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic, research in Argentina. Cassan F. D. y Garcia I.de Salamone (Eds), Asociación de Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina Cap. 4 pp. 61-86.*
6. Castilla P. 2010. “*Remoción de ortofosfatos y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas*”. Tesis para obtener el grado de especialidad en biotecnología. Universidad Autónoma metropolitana. México D. F.
7. Chen B., Wan C., Mehmood M. A., Chang J-S., Bai F., Zhao X. 2017 “*Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review*”. *Bioresource Technology* 244: 1198–1206.
8. Chih-hung H., Wen-Teng W. 2009. “*Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation*”. *Bioresource Technology* 100: 3921–3926.
9. Chisti Y. 2007. “*Biodiesel from microalgae*”. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.
10. Chisti Y., Jauregui-Haza U. J. 2002. “*Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated air-lift bioreactors*”. *Biochemical Engineering Journal* 10: 143–153.
11. Chojnacka K., Marquez-Rocha F. J. 2004. “*Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae*”. *Biotechnology* 3: 21-34.
12. Chun-Yen C., Kuei-Ling Y., Rifka A., Duu-Jong L., Jo-Shu C.. 2011. “*Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review*”. *Bioresource Technology* 102: 71–81.

13. Cruz Muñoz M. J., 2014 “*Cultivo de microalgas en fotobiorreactor para la obtención de moléculas precursoras de biodiesel (triacilglicéridos)*”. Tesis para obtener la especialización en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F.
14. Courchesne N. M. D., Albert Parisien A., Wang B., Lan C. Q. 2009. “*Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches*”. *Journal of Biotechnology* 141: 31–41.
15. Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2010, “*Third generation biofuels from microalgae*” in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Mendez-Vilas A (ed.), Formatex, 1355-1366.
16. Elrayies G. M. 2018. “*Microalgae: Prospects for greener future buildings*”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 81 (2018) 1175–1191.
17. Flynn K. 1991. “*Algal carbon-nitrogen metabolism: a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake*”. *J. of Plankton Research*. 13(1):373-87.
18. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. 1957. “*A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*”. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.
19. Garibay Hernández A., Vázquez-Duhalt R., Sánchez Saavedra P., Serrano Carreón L., Martínez Jiménez A. 2009 “*Biodiesel a Partir de Microalgas*”. *Revista Anual BioTecnología SMBB* (13): 38-61.
20. Ghosh S., Roy S., Das D. 2017. “*Enhancement in lipid content of Chlorella sp. MJ 11/11 from the spent medium of thermophilic biohydrogen production process*”. *Bioresource Technology* 223: 219–226.
21. Griffiths M. J., van Hille R. P., Harrison S. T. L. 2012. “*Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions*”. *Journal of Applied Phycology* 24 (5): 989-1001.
22. Hosseini N. S., Shang H., Ross G. M., Scott J. A. 2016. “*Comparative analysis of top-lit bubble column and gas-lift bioreactors for microalgae-sourced biodiesel production*”. *Energy Conversion and Management* 130: 230–239.
23. Huber M., Villar Vázquez R. 2009. “*Determinación de k_La en biorreactor air-lift*”. *Prácticas de la asignatura de Biorreactores del plan de estudio de Biotecnología*. Universidad Autónoma de Barcelona.
24. Jones S. M. J., Harrison S. T. L. 2014. “*Aeration energy requirements for lipid production by Scenedesmus sp. in air-lift bioreactors*”. *Algal Research* 5: 249–257.

25. Kazim S. A., 2012, “*Experimental & empirical correlations for the determination of the overall volumetric mass transfer coefficients of carbon dioxide in stirred tank bioreactors*”, A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of M.E.Sc in Chemical & Biochemical Engineering, The University of Western, Ontario, Canada.
26. Kuan-chen C., Ming R., Ogdeno K. L. 2013. “*Statistical optimization of culture media growth and lipid producción of Chlorella protothecoides UTEX 250*”. Bioresource Technology 128: 44-48.
27. Kumar K., Das D. 2012. “*Growth characteristics of Chlorella sorokiniana in airlift and bubble column photobioreactors*”. Bioresource Technology 116: 307–313.
28. Liu J., Huang J., Fan K. W., Jiang Y., Zhong Y., Sun Z., Chen F. 2010. “*Production potential of Chlorella zofingienesis as a feedstock for biodiesel*”. Bioresource Technology 101: 8658–8663.
29. Liu, J., Qiu, W., Song, Y., 2016. “*Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus quadricauda*”. Algal Res. 18: 273–280.
30. Liu, T., Liu, F., Wangm, C., Wang, Z., Li, Y. 2017. “*The boosted biomass and lipid accumulation in Chlorella vulgaris by supplementation of synthetic phytohormone analogs*”. Bioresour. Technol. 232: 44–52.
31. Lizardi Jiménez M. A. 2011 “*Contribución al estudio de la hidrodinámica y transferencia de masa en biorreactores airlift de tres fases: producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo*”. Tesis para la obtención de grado de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México.
32. Matthes S., Martin Matschke M., Cotta F., Grossmann J., Griehl C. 2015. “*Reliable production of microalgae biomass using a novel microalgae platform*”. Journal of Applied Phycology 27:1755–1762.
33. McSteen P., Zhao Y. 2008 “*Plant hormones and signaling: common themes and new developments*”. Development Cell. 14: 467–473.
34. Mehltitz T. H. 2009. “*Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors*”. Tesis para la obtención de Maestría. California Polytechnic State University, USA.

35. Mehrnia M., Towfighi J., Bonakdarpour B. y Akbainejad M. 2005. “*Gas Hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum based liquids*”. *Biochemical Engineering Journal*. 22: 105-110.
36. Moreda W., Pérez-Camino M.C., Cert A. 2003. “*Improved method for the determination of triacylglycerols in olive oils by high performance liquid chromatography*”. *Grasas y Aceites* 54: 175-179.
37. Nelson D. L., Cox M. M., 2005. “*Lehninger Principles of Biochemistry*”. W. H. Freeman and Company. New York. Fourth edition: pp: 345-346 and 766.
38. Nielsen J., Villadsen J. y Liden G. 2003. “*Mass transfer*” En: *Bioreactor Engineering Principles*. Kuwler Academic/Plenum Publishers, New York.
39. Pires J. C. M., Alvim-Ferraz M. C. M., Martins F. G. 2017. “*Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review*”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79: 248–254.
40. Poonam, S., Sheena, K., Abhishek, G., Rohit, M., Ismail, R., Faizal, B. 2016. “*Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae*”. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55: 1–16.
41. Prakash B. and Paturi N. B. 2017. “*Optimization of environmental factors affecting tertiary treatment of municipal wastewater by chlorella protothecoides in a lab scale photobioreactor*”. *Journal of Water Process Engineering*. 17:290-298.
42. Qiaoning H., Haijian Y., Chunxiang H. 2016. “*Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond*”. *Bioresource Technology* 218: 571-579.
43. Ramírez Mérida L. G., Queiroz Zepka L., Jacob-Lopes E. 2013. “*Fotobiorreactor: herramienta para cultivos de cianobacterias*”. *Ciencia y Tecnología* 6(2): 9-19.
44. Rodríguez Gonzáles A. M., Serrano Luna F. A. 2012. “*Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de Chlorella vulgaris UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio*”. Trabajo de grado presentado para optar el título de ingeniero químico. Universidad Industrial Santander. Bucaramanga, Colombia.
45. Romanowicz L., Galewska Z., Gogiel T., Jaworski S., Sobolewski K. 2008. “*Fatty acid composition of triacylglycerols from Wharton's jelly determined by high-performance liquid chromatography*”. *Journal of Biochemical. Biophysical and. Methods* 70: 973–977.

46. Salama, E., Akhil, N.K., Ji, M., Jung, R.K., Booki, M., Jeon, B. 2014. “*Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones*”. *Bioresour. Technol.* 172, 97–103.
47. Shariati F.P., Bonakdarpour B. y Mehrnia M.R. 2007. “*Hydrodynamics and oxygen transfer behaviour of water in diesel microemulsions in a draft tube airlift bioreactor*”. *Chemical Engineering and Processing.* 46: 334–342.
48. Sheng-Yi C., Ming-Ta T., Chien-Ya K., Seow-Chin O., Chih-Sheng L. 2009. “*The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal*”. *Eng. Life Sci* 3: 254-260.
49. Spaepen S., Vanderleyden J. 2010. “*Auxin and Plant-Microbe Interactions*”, Cold Spring Harb Perspect Biol.
50. Sun Z., Zhou Z-g. Gerken H., Chen F., Liu J. 2015. “*Screening and characterization of oleaginous Chlorella strains and exploration of photoautotrophic Chlorella protothecoides for oil production*”. *Bioresource Technology:* 184: 53–62.
51. Tan X., Uemura Y., Lim J. W., Wong C. Y., Keat Teong Lee K. T. 2017. “*Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing*”. *Chinese Journal Chemical Engineering.* doi:10.1016/j.cjche.2017.08.010.
52. Torres Mancera M. T. 2013. “*Obtención de ácido clorogenico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio solido*”. Tesis para la obtención de grado de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México.
53. Voß, U., Bishopp, A., Farcot, E., Bennett, M.J. 2014. “*Modelling hormonal response and development*”. *Trends Plant Sci.* 19, 311–319.
54. Wang T., Tian X., Liu T., Wang Z., Guan W., Guo M., Chu J., Zhuang Y. 2016. “*Enhancement of lipid productivity with a novel two-stage heterotrophic fed-batch culture of Chlorella protothecoides and a trial of CO2 recycling by coupling with autotrophic process*”. *Biomass and Bioenergy* 95: 235-243.
55. Yu Z., Pei H., Hou Q., Nie C., Zhang L. 2018. “*Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae*”. *Bioresource Technology* 247: 904–914.

11. Anexos

Anexo A. Cálculos de P_X , R_C y P_L para medio Bristol 3N y Bayfolan

Para estimar la productividad de biomasa (P_X) se sustituirán valores en la ecuación 3 descrita en materiales y métodos; tomando los valores de biomasa de la Tabla 5 tenemos: $X_{\max} = 0.1272 \text{ g L}^{-1}$ y $X_0 = 0.0872 \text{ g L}^{-1}$ para *C. protothecoides* cultivado en medio Bristol 3N y $X_{\max} = 0.2234 \text{ g L}^{-1}$ y $X_0 = 0.3897 \text{ g L}^{-1}$ para *C. protothecoides* cultivado en medio Bayfolan; por último, el valor n para las dos productividades es de 8.8 días.

Sustituyendo estos valores en la ecuación tenemos que *C. protothecoides* cultivado en medio Bristol 3N la productividad de biomasa (P_{X1}) es:

$$P_{X1} = \frac{0.1272 \text{ g L}^{-1} - 0.0871 \text{ g L}^{-1}}{8.8 \text{ d}} = 0.0046 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

La productividad de biomasa (P_{X2}) en medio Bayfolan es:

$$P_{X2} = \frac{0.3897 \text{ g L}^{-1} - 0.2234 \text{ g L}^{-1}}{8.8 \text{ d}} = 0.0189 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

Teniendo los valores P_{X1} , P_{X2} y los valores de carbono elemental (C_C) de la Tabla 6, se calculó la fijación de CO_2 de *C. protothecoides* cultivado en los dos medios Bristol 3N y Bayfolan; estimando los pesos moleculares del carbono ($M_C = 12 \text{ g mol}^{-1}$) y del CO_2 ($M_{\text{CO}_2} = 44 \text{ g mol}^{-1}$) se utilizó la ecuación 5 descrita en materiales y métodos. La fijación de CO_2 de *C. protothecoides* cultivado en medio Bristol 3N (R_{C1}) es:

$$R_{C1} = 34.30 * 0.0046 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1} * \left(\frac{44 \text{ g mol}^{-1}}{12 \text{ g mol}^{-1}} \right) = 0.5785 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

La fijación de CO_2 de *C. protothecoides* cultivado en medio Bayfolan (R_{C2}) es:

$$R_{C2} = 28.26 * 0.0189 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1} * \left(\frac{44 \text{ g mol}^{-1}}{12 \text{ g mol}^{-1}} \right) = 1.9584 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

Anexo B. Cálculo de %_L y P_L en medio Bayfolan

La ecuación 1 se utilizó para la determinación de lípidos totales (%_L) de *C. protothecoides*, definimos como: $m = 0,1938$ g, $m_1 = 10,5591$ g y $m_2 = 10,5635$ g. Sustituyendo los valores en la ecuación:

$$\%_L = \frac{10,5635g - 10,5591g}{0,1938g} \times 100 = 2.27 \% \text{ de lípidos totales}$$

Una vez calculado el valor de %_L se dispuso a calcular el valor de la productividad de lípidos (P_L) utilizando la ecuación 4, conocemos la productividad de biomasa (P_X) 0,0189 g L⁻¹ d⁻¹, por lo que el cálculo de P_L sería:

$$P_L = 0.0189 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1} * 2.27\% * 100 = 4.29 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

Esto da un P_L de 0.0189g L⁻¹ d⁻¹ para el cultivo de *C. protothecoides* en medio Bayfolan.

Anexo C. Estimación de productividad de biomasa en el fotobiorreactor airlift en condiciones abióticas

Para estimar el flujo acumulado de CO₂ (A_{CO₂}) dentro del sistema, se despreció el porcentaje de CO₂ del aire (0.039%) y se realizó una simple resta entre el flujo de entrada de CO₂ (E_{CO₂}) y el flujo de salida de CO₂ (S_{CO₂}) estos valores se pueden encontrar en la Figura 33:

$$A_{CO_2} = E_{CO_2} - S_{CO_2} = 50 \text{ mL min}^{-1} - 34 \text{ mL min}^{-1} = 7.5 \text{ mL min}^{-1}$$

El flujo que se acumula dentro del sistema es de 7.5 mL min⁻¹, para convertir el flujo volumétrico a másico primero se transforma a flujo molar, por ley de gases ideales se obtiene que para una 1 mmol de CO₂ se tiene un volumen de 22.4 mL de CO₂ suponiendo que el CO₂ se comporta de forma ideal; una vez calculado el flujo molar se pasa a flujo másico con el peso molecular del CO₂ (44 mg mol⁻¹). La conversión quedaría de la siguiente forma:

$$7.5 \text{ ml min}^{-1} \text{ de } CO_2 \left(\frac{1 \text{ mmol de } CO_2}{22.4 \text{ mL de } CO_2} \right) \left(\frac{44 \text{ mg de } CO_2}{1 \text{ mmol de } CO_2} \right) = 14.732 \text{ mg min}^{-1} \text{ de } CO_2$$

El volumen de operación del fotobiorreactor es de 2.1L, dividiendo 14.732 mg min⁻¹ de CO₂ que obtuvimos podemos estimar el flujo másico por unidad de volumen el cual da un valor de 7.015 mg L⁻¹min⁻¹. Se ha reportado que para producir 1 g de biomasa de microalga (X) se necesita 1.8 g de CO₂ (Pires et. al. 2017, Elrayies, 2018), con esta conversión se realizó el cálculo para hacer una estimación de la productividad de biomasa (P_X) que podría generarse por unidad de tiempo en el fotobiorreactor tipo airlift. Ajustando la conversión a mg tenemos que:

$$7.015 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ de } CO_2 \left(\frac{1 \text{ mg de } X}{1.8 \text{ mg de } CO_2} \right) = 3.897 \text{ mg X L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ de } X$$

Haciendo un acomodo de unidades la estimación de P_X fue de 5.612 g X L⁻¹ d⁻¹ a un flujo de 500 mL min⁻¹. Los cálculos referentes al flujo de 1000 mL min⁻¹, se realizan de la misma forma primero se calcula el CO₂ acumulado:

$$A_{CO_2} = E_{CO_2} - S_{CO_2} = 25 \text{ mL min}^{-1} - 17,5 \text{ mL min}^{-1} = 16 \text{ mL min}^{-1}$$

Después se pasa a flujo másico:

$$16 \text{ ml min}^{-1} \text{ de } CO_2 \left(\frac{1 \text{ mmol de } CO_2}{22.4 \text{ mL de } CO_2} \right) \left(\frac{44 \text{ mg de } CO_2}{1 \text{ mmol de } CO_2} \right) = 31.429 \text{ mg min}^{-1} \text{ de } CO_2$$

Dividiendo este valor por 2.1 L que es el volumen de operación nos da como resultado 14.966 $\text{mg L}^{-1} \text{min}^{-1}$ haciendo la conversión de CO_2 a biomasa (X):

$$14.966 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ de } CO_2 \left(\frac{1 \text{ mg de } X}{1.8 \text{ mg de } CO_2} \right) = 8.314 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ de } X$$

Cambiando las unidades a $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ tenemos una estimación de P_X igual a $11.973 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para un flujo de 1000 mL min^{-1} .



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00189

Matrícula: 2161800917

CULTIVO DE MICROALGAS EN FOTOBIOREACTOR AIRLIFT PARA LA OBTENCIÓN DE PRECURSORES DE BIODIESEL

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de enero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. PATRICIA RUIZ SANCHEZ
DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
DR. JOSE ANTONIO MARTINEZ RUIZ

siendo los dos primeros asesores del alumno y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: DAVID JESUS TORRES MANCERA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



DAVID JESUS TORRES MANCERA
ALUMNO

REVISÓ
[Signature]

LIC. JULIO CESAR DE JARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

ASESORA

[Signature]

DRA. PATRICIA RUIZ SANCHEZ

ASESOR

[Signature]
DR. JESUS GERARDO SAUCEDO
CASTAÑEDA

LECTOR

[Signature]

DR. JOSE ANTONIO MARTINEZ RUIZ