

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**FACTIBILIDAD DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE BIODIESEL  
A PARTIR DE ACEITE DE MICROALGAS UTILIZANDO *Rhizopus oryzae*  
COMO CATALIZADOR *WHOLE-CELL***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**KARLA JESÚS ARAYA CASTRO**

**PROFESOR GUÍA: DR. GUSTAVO ANDRÉS CIUDAD BAZAUL**

**TEMUCO – CHILE**  
**2013**

“Factibilidad de producción biotecnológica de biodiesel a partir de aceite de microalgas utilizando *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell*”

PROFESOR GUIA

: \_\_\_\_\_  
Dr. Gustavo Ciudad Bazaul  
Depto. Ingeniería Química  
Fac. Ing., Cs. y Administración

PROFESOR CO-GUÍA

: \_\_\_\_\_  
Dra. Maribel Parada Ibáñez  
Depto. Cs. Agronómicas y RRNN  
Fac. Cs. Agropecuarias y Forestales

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

*De forma especial quiero agradecer a mis padres, quienes además de darnos la vida, nos han entregado parte de las suyas, postergado muchas veces sus propios sueños para impulsar la puesta en marcha de los nuestros. A mi Erikita, la mamá con más garra que Dios pudo predestinar para acompañar mi travesía, gracias a su coraje y tenacidad forjé mi carácter. A mi Paulinito, el hombre de los ojos más lindos, el papá más perseverante, y de quien heredé ese particular sentido del humor con el cual los problemas se enfocan distinto.*

*A mi hermana, Paulina, por ser tantas veces mi fuente de inspiración; a mi hermano Erik, por haber guiado mis primeras batallas. A mi hermanita del destino, Feñota, por ser la partner de tantas aventuras y mi primer apoyo al llegar a esta región.*

*Especial reconocimiento merecen todos con quienes compartí a diario en el laboratorio de Biocombustibles y Materiales, a Noelia, por su constante apoyo y por hacerme sentir capaz de alcanzar cualquier meta; a Pamela, Simonet, Aixa, y María Eugenia, porque con su cariño y amistad me motivaron y orientaron desde el comienzo. A mi equipo, Agnes, Alexis, Diego, Álvaro, por haberme enseñado a enseñar y con quienes experimenté el orgullo de un progreso ajeno. A Dani, Idi, Maca, Diego Reyes y Pedro, por las carcajadas liberadoras.*

*Quiero agradecer al Dr. Gustavo Ciudad, por todas las lecciones que me hicieron crecer, por la confianza que me permitió explorar nuevos desafíos y responsabilidades que nunca imaginé asumir a mi corta edad, porque las herramientas que me entregó me hicieron sentir segura para escalar con mis propias manos, y por darme la posibilidad de formar parte de un bonito grupo humano en el BIOREN. A la Dra. Maribel Parada, por haber construido gran parte de los cimientos en mi formación profesional, por su mirada crítica y sabios consejos, alguien con quien siempre he podido compartir mis triunfos y fracasos, orientando siempre mi mirada al frente, su entrega y profesionalismo la han convertido en un referente.*

*Un agradecimiento muy especial merecen los docentes que marcaron mi aprendizaje con su particular sello, Horacio Miranda, Juan Carlos Hermosilla, Rosa Rubio, Pamela Ibarra, Emma Bensch, Andrés Ávila, Ricardo Felmer, Mario Villouta. A Alejandra Sandoval, por la paciencia, por escuchar e incentivar la realización de mis anhelos. Como no dedicar unas líneas a Cecilia Bastías y Carlos Belmar, por la gran acogida a mi llegada.*

*Deseo expresar mi gratitud a los amigos de siempre, Mauricio, porque soportó todas mis locuras, los viajes, los conciertos, y las maldades; también agradezco a sus padres por todas las veces que me recibieron en su casa como parte de la familia. A Tomás, por la música que une, porque cada vorágine emocional tuvo la compañía y la atmósfera perfecta. A los que siempre han estado de las más diversas formas, Solange, Felipe, Pipe, Camila y Daniela. También agradecer a los amigos que me acompañaron durante estos 5 años de universidad, Marcelo, Coni, Vivi, y Fernanda.*

*Considerando la problemática del escaso espacio determinado en este trozo de papel, mi intención es entonces, corresponder a todo aquel que haya sido partícipe de esta etapa, directa o indirectamente, opinando, corrigiendo, dando ánimo, o simplemente regalando una sonrisa, a todos ellos, les hago extensivo mi más sincero agradecimiento.*

## ÍNDICE

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b>	IX
<b>SUMMARY</b>	X
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	4
2.1. Producción de Biodiesel: Transesterificación	4
2.2. Lipasas como catalizador en la producción de FAAE	5
2.3. Lipasas de <i>Rhizopus oryzae</i>	7
2.4. Enzima inmovilizada	9
2.5. Inhibición de la lipasa por alcoholes de cadena carbonada corta	10
2.6. Microorganismo productor de lipasas (LPM) como catalizador <i>whole-cell</i>	11
2.7. Biorreactor multifase para la producción de FAAE	13
2.8. Aceite de microalgas como materia prima para la producción de FAAE	16
<b>3. HIPÓTESIS</b>	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos específicos	19
<b>4. METODOLOGÍA</b>	20
4.1. Material biológico y condiciones de cultivo	20
4.1.1. Microalgas	20
4.2. Extracción de lípidos de microalgas por método Soxhlet con éter de petróleo (APHA 1998)	21
4.2.1. Obtención de la fracción de ácidos grasos transesterificables en los aceites de microalgas	22
4.3. Inoculación al biorreactor multifase	23
4.4. Condiciones operacionales del biorreactor multifase y diseño experimental	24
4.4.1. Cinética de la reacción	24

4.5	Toma de muestras	25
4.6.	Determinación del Índice de Acidez (I.A)	25
4.7.	Detección y cuantificación de FFAE por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS)	26
4.8.	Determinación de viabilidad para la reutilización del catalizador <i>whole-cell</i>	27
4.8.1.	Re-inoculación del catalizador <i>whole-cell</i>	27
4.8.2.	Reutilización del catalizador <i>whole-cell</i>	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	29
5.1.	Contenido de ácidos grasos transesterificables en los aceites de microalga	29
5.2.	Condiciones de operación para la producción de biodiesel utilizando <i>R. oryzae</i> como catalizador <i>whole-cell</i> en un biorreactor multifase	32
5.2.1.	Efecto de la concentración de alcohol en el rendimiento de FFAE	34
5.2.2.	Cinética de la reacción	39
5.3.	Reutilización del catalizador <i>whole-cell</i>	41
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	43
<b>7.</b>	<b>PROYECCIONES</b>	44
<b>8</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	45
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas en la reacción de transesterificación, con etanol como aceptor acilo.	4
Figura 2.	Morfología microscópica de <i>Rhizopus oryzae</i> .	7
Figura 3.	Concepto de biorreactor multifase con un catalizador <i>whole-cell</i> para la producción de FAAE.	15
Figura 4.	Esquema conceptual del sistema Soxhlet.	21
Figura 5.	Diseño del proceso para la preparación de los sistemas multifase de acuerdo a cada tratamiento.	23
Figura 6.	Experimentos de re-inoculación del catalizador <i>whole-cell</i> .	27
Figura 7	Rendimiento de FAME para diferentes temperaturas, con una razón molar Alcohol/Lípido (A/L) de 4/1 [mol/mol].	33
Figura 8	Rendimiento de FAME a 20°C, para diferentes razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol].	35
Figura 9	Grafica de efectos principales para el rendimiento de FAME con diferentes razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol], utilizando dos niveles de temperaturas, y etanol como aceptor acilo.	36
Figura 10	Grafica de contorno para el rendimiento de FAAE, con dos razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol], utilizando dos niveles de temperaturas, etanol como aceptor acilo, y aceite de <i>N. gaditana</i> como materia prima.	37
Figura 11	Cinética de producción de FAAE y ácidos grasos libres, usando etanol como aceptor acilo y dos aceites de microalga.	39
Figura 12	Ensayo de reutilización del microorganismo luego de un ciclo de producción de biodiesel.	41

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.	Clasificación enzimática de acuerdo a su acción catalítica específica.	5
Tabla 2.	Tratamientos del estudio de las condiciones operacionales para la producción de FAAE, utilizando <i>R. oryzae</i> como catalizador <i>whole-cell</i> .	24
Tabla 3	Contenido de lípidos transesterificables en los aceites obtenidos por método Soxhlet para las microalgas <i>B. braunii</i> y <i>N. gaditana</i> .	30



## RESUMEN

La utilización de lipasas como catalizadores en procesos de producción biodiesel (Fatty Acid Alkyl Ester, FAAE) ha promovido la investigación enfocada al uso de materias primas alternativas y de menor costo, tales como aceites vegetales reutilizados, residuos grasos de origen animal, o aceite de microalgas. Estudios previos han reportado el uso de diferentes Microorganismos Productores de Lipasas (LPM) como potenciales catalizadores *whole-cell* (o de célula entera), presentándose como una alternativa de procesamiento que elimina las etapas más costosas de la utilización de lipasas libres o inmovilizadas, como catalizador.

En el presente trabajo se determinó la factibilidad técnica de utilizar el LPM *Rhizopus oryzae*, como catalizador *whole-cell* para producir biodiesel en un innovador sistema de biorreactor multifase, a partir de aceite extraído de dos especies de microalgas: *Botryococcus braunii* (Bb), *Nannochloropsis gaditana* (Ng). Este biorreactor constó de 3 fases: una sólida compuesta de medio de cultivo para sustentar el crecimiento del hongo, una fase líquida correspondiente al aceite de microalgas, y una fase gaseosa saturada de alcohol (metanol o etanol, utilizados como aceptores acilos). El diseño experimental permitió evaluar la productividad del sistema en tres niveles de temperatura, y con diferentes razones molares de Alcohol/Lípido (A/L). La disposición de las tres fases facilitó un transporte por difusión, y la presencia de lipasas provenientes del LPM, el cual promovió la producción de FAAE.

De acuerdo a los resultados obtenidos se propone que las condiciones óptimas que hicieron factible el uso de este sistema, fue utilizar una razón molar Alcohol/Lípido de 8:1 [mol/mol], a 20°C, con etanol como aceptor acilo y aceite de *N. gaditana* como materia prima, y 96 horas de reacción, alcanzando así hasta un 91% de conversión a FAAE. Esto, demostró la factibilidad de utilizar *R. oryzae* como catalizador *whole-cell* para la producción de biodiesel, utilizando material complejo como el aceite de microalgas. Por otro lado, los resultados sugieren que de acuerdo a los tratamientos estudiados, no es posible reutilizar el microorganismo directamente luego de someterse a un ciclo de producción de biodiesel, debido probablemente a su inhibición por anaerobiosis. Es necesario generar una estrategia para mantener el hongo vivo y activo durante todo el proceso, para su uso en una nueva reacción como LPM.

## SUMMARY

The use of lipases as enzyme-catalysts for biodiesel production processes (Fatty Acid Alkyl Ester, FAAE) has promoted research focused in the use of alternative and cheaper raw materials such as recycled vegetable oils, waste animal fat, or microalgae oils. Previous studies have reported the use of different Lipase Producing Microorganisms (LPM) as potential *whole-cell* catalysts, presenting itself as an alternative that abolish the more costly stages of using free or immobilized lipases as catalyst.

In this study we investigated the feasibility of using the LPM *Rhizopus oryzae* as a *whole-cell* catalyst to produce biodiesel in an innovative multiphase bioreactor system, testing oils extracted from two microalgae strains: *Botryococcus braunii* (Bb), *Nannochloropsis gaditana* (Ng). The bioreactor is composed by three phases: a solid phase composed by culture media to support the fungus growth, a liquid phase corresponding to the microalgae oil, and a gaseous phase composed by evaporated alcohol (methanol or ethanol were used as acyl acceptors). The experimental design allowed us to assess the system's productivity under three temperature levels, and different Alcohol/Lipids (A/L) molar ratios. The arrangement of these three phases allowed a diffusive transport, and the presence of lipases from the LPM, promoted the production of FAAE.

According to the results it is suggested that the optimal conditions that makes feasible the use of this system, was to use an Alcohol/Lipid molar ratio of 8/1 [mol/mol], 20°C, with ethanol as acyl acceptor and *N. gaditana* oil as feedstock, and 96 reaction hours, reaching up to 91% of FAAE conversion. This has demonstrated the feasibility to use *R. oryzae* as a *whole-cell* catalyst for biodiesel production using complex raw materials, as microalgae oils. Furthermore, the results suggest that according to the reutilization treatments studied, it is not possible to re-use the microorganism directly after a biodiesel production cycle, probably due to its inhibition caused by anaerobiosis. It's necessary to propose a strategy to keep the fungus alive and active throughout the entire process, to re-use it for a new reaction as Lipase Producing Microorganism.

## 1. INTRODUCCIÓN

El exponencial aumento en el precio del crudo y el inminente agotamiento de los combustibles fósiles, ha impulsado el desarrollo y la implementación de nuevas fuentes de energía renovable, que a su vez resulten amigables con el medio ambiente. En este contexto, la producción y utilización de biocombustibles ha generado un renovado interés a nivel mundial, por su contribución en la diversificación de la matriz energética, reducción en la dependencia de los combustibles derivados del petróleo, y la disminución de las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI), entre otras ventajas.

En particular, el biodiesel o ésteres alquílicos de ácidos grasos (Fatty Acid Alkyl Ester, FAAE), es un combustible alternativo producido por la esterificación y/o transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites residuales y también de algas. En la actualidad los aceites vegetales son las principales materias primas utilizadas en la producción de biodiesel a escala industrial, y a su vez, la transesterificación de los triglicéridos (TG) y la esterificación de ácidos grasos libres (Free Fatty Acid, FFA) por catálisis química es la principal ruta para la conversión de aceites vegetales y grasas animales en biodiesel.

A pesar de que el proceso convencional de producción de FFAE ha sido ampliamente utilizado, la catálisis química, ya sea ácida o alcalina, ha demostrado limitaciones que restringen sus aplicaciones ya que los catalizadores son irrecuperables, generando grandes volúmenes de residuos líquidos, aumentando los costos e impactos medioambientales de la producción.

Por otra parte, la producción de biodiesel presenta problemas relacionados con el alto valor de las materias primas que se usan convencionalmente, como los aceites vegetales puros o de semillas, que constituyen entre el 70% y el 85% del costo total de producción de biodiesel (Kargbo, 2010; Rohani *et al.*, 2011). La sustitución de estos aceites por otros de menor costo, no es factible utilizando el proceso convencional con catalizadores alcalinos, ya que los FFA generalmente presentes en materias primas alternativas, son compuestos que reaccionan con este

tipo de catalizador, favoreciendo los procesos de saponificación (Xu *et al.*, 2006). Estas limitaciones han motivado el desarrollo de nuevas líneas de investigación, enfocadas tanto a la búsqueda de nuevas fuentes de aceite, como también a la aplicación de catalizadores que sean más versátiles y que no presenten las falencias ambientales que conlleva el uso de catalizadores químicos.

Las microalgas son microorganismos que pueden utilizar CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y luz solar como energía para acumulación de aceite en determinadas condiciones ambientales, además pueden ser cultivadas en agua salada de baja calidad o en aguas residuales con cierta carga de nutrientes, y lugares donde no hay cantidad o calidad de suelos para realizar los cultivos alimenticios convencionales. Es así como las microalgas se han convertido en potencial materia prima para la producción de diferentes biocombustibles como el biogás, bioetanol, hidrógeno, hidrocarburos, y también FFAE.

La utilización de lipasas libres o inmovilizadas en alguna matriz, para su aplicación como catalizador, permite el uso de materias primas con un alto índice de acidez, esto se debe a que junto con llevar a cabo la transesterificación de TG, estas enzimas son capaces de esterificar los FFA para producir FFAE. No obstante, su aplicación a escala industrial es debatible, puesto que su rendimiento puede ser bajo, y su utilización resulta muy costosa, ya que además los problemas de inhibición y pérdida de actividad producidos por el contacto de las enzimas con alcoholes de cadena corta, han imposibilitado su reutilización.

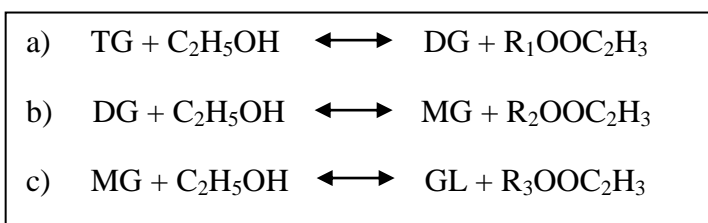
En este sentido y gracias al desarrollo de la biotecnología, se ha creado gran expectativa en un método promisorio para aplicar lipasas en la reacción de producción de FFAE, utilizando las propias enzimas intracelulares o extracelulares de un Microorganismo Productor de Lipasas (Lipase Producing Microorganism, LPM) como catalizador *whole-cell* (o de célula entera). Recientemente, Ciudad y colaboradores (2011) desarrollaron un novedoso biorreactor multifase para disminuir el efecto inhibitorio del alcohol sobre *Rhizopus oryzae* (catalizador *whole-cell*).

En definitiva, la producción biotecnológica de FAAE a partir de aceite de microalgas es una tecnología incipiente y no ha sido suficientemente explorada. A la fecha, no existen investigaciones previas que reporten el uso de este tipo de materia prima en procesos que apliquen un LPM como catalizador *whole-cell* para la producción de FAAE; y por sobretodo, resulta de gran importancia evaluar su rendimiento en un sistema multifase, utilizando material complejo bruto, tal como el aceite de microalgas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Producción de Biodiesel: Transesterificación

La transesterificación es el proceso químico mediante el cual un triglicérido es convertido en moléculas de cadena lineal más pequeñas, en presencia de un alcohol. Esta reacción suele ser realizada con un catalizador alcalino, ácido, o enzimático (Barnwal y Sharma, 2005; Moser, 2009; Lam *et al.*, 2010). Este proceso, se basa en una secuencia de tres reacciones (Figura 1), produciéndose una molécula de éster por cada glicérido en cada paso: conversión de triglicéridos (TG) a diglicéridos (DG); conversión de diglicéridos a monoglicéridos (MG); conversión de monoglicéridos a glicerina (GL).



**Figura 1.** Etapas en la reacción de transesterificación, con etanol como aceptor acilo. a) Conversión de triglicéridos (TG) a diglicéridos (DG); b) Conversión de diglicéridos a monoglicéridos (MG); c) Conversión de monoglicéridos a glicerina (GL). Modificado de Ávila *et al.*, (2008).

De acuerdo a esto, se generan 3 moléculas de ésteres de ácidos grasos (biodiesel), y 1 molécula de glicerol (subproducto utilizado en la industria cosmética, alimenticia, y farmacéutica). En esta reacción convencionalmente se utiliza un catalizador a fin de incrementar la velocidad del proceso y su rendimiento; además, se necesita un exceso de alcohol para aumentar la conversión a ésteres.

La elección del catalizador químico dependerá de la materia prima con la que se cuente. Sin embargo, la robustez de los catalizadores enzimáticos permite trabajar con un amplio rango de materias primas.

## 2.2. Lipasas como catalizadores en la producción de FAAE

Las enzimas son catalizadores biológicos (o biocatalizadores) de naturaleza proteica, cuya función es realizar la catálisis de ciertas reacciones biológicas. Existe una clasificación determinada para cada clase de enzima, dependiendo específicamente del tipo de reacción química que cataliza, el grupo donador y el aceptor, describiéndose seis grupos principales (Tabla 1).

<b>Código</b>	<b>Grupo</b>	<b>Función</b>
EC1	Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción, es decir, transferencia de Hidrógeno (H) o electrones ( $e^-$ ) de un sustrato a otro.
EC2	Transferasas	Catalizan la transferencia de un grupo funcional de una molécula a otra.
EC3	Hidrolasas	Catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, es decir, separa las uniones éster mediante la adición de agua.
EC4	Liasas	Catalizan la ruptura de enlaces químicos en compuestos orgánicos, y el resultado del proceso de ruptura se forman frecuentemente nuevos dobles enlaces o nuevas estructuras de anillo.
EC5	Isomerasas	Transfieren grupos en el interior de la molécula, realizando un reordenamiento electrónico, para originar formas isoméricas.
EC6	Ligasas	Catalizan la formación de diversos enlaces químicos entre dos moléculas de gran tamaño, a expensas de la ruptura del ATP u otra molécula donadora similar (de gran energía).

**Tabla 1.** Clasificación enzimática de acuerdo a su acción catalítica específica. Modificado de Kirk y Othmer (1962).

En particular, las lipasas [triacilglicerol éster hidrolasas (E.C.3.1.1.3)] son un tipo de enzimas hidrolíticas que ocupan un lugar importante entre los biocatalizadores industriales, las cuales han cobrado gran relevancia por su potencial aplicación en diversos procesos biotecnológicos (Benjamín y Pandey, 1998), ya que se reducen considerablemente los costos energéticos y de tratamiento de residuos, que al realizarse mediante síntesis química, requerirían de condiciones más drásticas (Koeller *et al.*, 2001).

Estas enzimas poseen un mecanismo de acción muy singular, denominado “activación interfacial”, cuando esta lipasa se encuentra en un medio polar, la tapadera o “lid” se encuentra cerrada. Esto provoca que la enzima esté protegida y solamente pueda actuar en la interfase lípido-agua generada por una emulsión (Akoh *et al.*, 2004), este efecto de las interfases tiene consecuencias positivas en la actividad, constituyendo la principal diferencia entre las lipasas y otras enzimas de tipo hidrolítico como las esterasas, las cuales catalizan la hidrólisis únicamente de ésteres que se encuentren en solución.

Las lipasas muestran una alta especificidad sobre los sustratos (Rivera y García, 2007), esta característica refleja una gran ventaja para la producción enzimática de FAAE en comparación con el proceso convencional utilizando catalizadores alcalinos, ya que estas enzimas promueven directamente la transesterificación de triglicéridos, y la esterificación de ácidos grasos libres (FFA) para ser convertidos en FAAE, evitando reacciones indeseables de saponificación. Esto permite el uso de materias primas con alto contenido de ácidos grasos libres, tales como los aceites de fritura, aceites de microalgas y aceites de *Jatropha* (Azócar *et al.*, 2010).

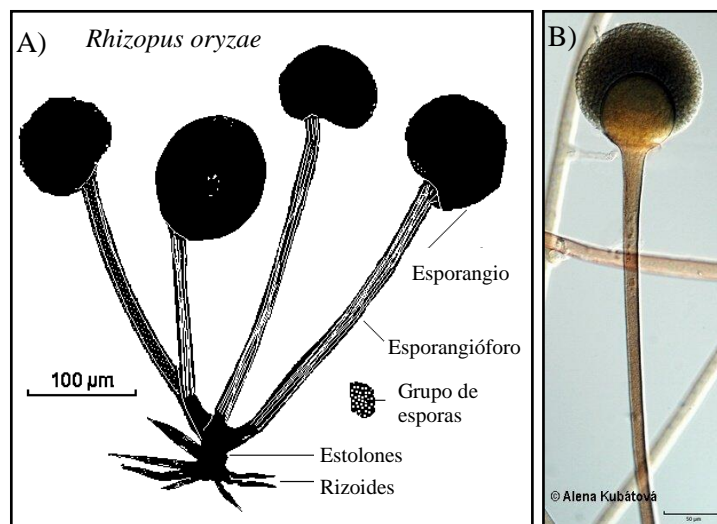
El mecanismo de las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por lipasas, se basa en la acción de una triada catalítica típica de estas enzimas, la cual se compone de serina, ácido aspártico o ácido glutámico, e histidina; estos tres aminoácidos son los que conforman el llamado sitio activo. En los procesos catalizados por lipasas, la producción de FAAE se lleva a cabo por transesterificación, mediante la donación o aceptación de protones en los grupos funcionales ácidos o básicos, que se encuentran en el sitio activo de las enzimas (Al-Zuhair *et al.*, 2007). La



reacción se produce en las etapas mencionadas anteriormente (Figura 1), con mono y diacilglicerol (MG y DG) como productos intermedios para producir finalmente; FAAE y glicerol. Al finalizar el proceso de transesterificación, la fase inferior (glicerol) simplemente se separa de la fase superior (biocombustible), la desodorización y neutralización del producto no son necesarias (Antczak *et al.*, 2009).

### 2.3. Lipasas de *Rhizopus oryzae*

*Rhizopus oryzae* (Figura 2) es un hongo filamentososo y lipolítico, de amplia distribución geográfica, que crece sobre materia orgánica muerta; puede colonizar semillas o granos, materia fecal de origen animal, pan de molde, entre otros. Posee prominentes rizoides, que dan origen a largos esporangióforos, hifas tubulares gruesas e incoloras, aseptadas, de abundante crecimiento aéreo con textura algodonosa, y esporangios esféricos de 50 a 250  $\mu\text{m}$  de diámetro que contienen esporangiosporas espiculadas de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de largo. Entre los componentes de su pared celular podemos encontrar quitosano y quitina, compuestos insolubles en agua o solventes orgánicos.



**Figura 2.** Morfología microscópica de *Rhizopus oryzae*. A) Esquema conceptual de sus diferentes estructuras; B) Esporangióforo y su esporangio maduro, visto con microscopio óptico a 400x. Imagen tomada desde la web del Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias, Charles University, Prague, Czech Republic.

Este zygomyceto, perteneciente al orden de los mucorales, también es un patógeno humano oportunista, siendo uno de los más frecuentes agentes causales de zigomicosis (o mucormicosis), cuyos casos se han reportado principalmente en individuos inmunocomprometidos. No obstante, algunas cepas de *Rhizopus* incluyendo *R. oryzae*, han sido ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, y sus productos son generalmente reconocidos como seguros. Esta cepa es conocida por su capacidad de producir metabolitos como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido fumárico), enzimas hidrolíticas (glucoamilasas, poligalacturonasas), e incluso etanol, a partir de pentosas y residuos agrícolas (Takahashi *et al.*, 1978; Yu y Hang 1989; Carta *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2003; Mass *et al.*, 2006; Thongchul *et al.*, 2010).

La lipasa producida por este hongo de forma extracelular (*Rhizopus oryzae* Lipase, ROL) es de elevado interés en procesos biotecnológicos y en investigación académica, ya que es muy utilizada en la resolución de mezclas racémicas debido a su gran regioespecificidad. Esta enzima actúa hidrolizando de manera preferente las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos, ya que pertenecen a un grupo de lipasas que son activas frente a ésteres de alcoholes primarios (Ben Salah *et al.*, 1994; Hiol *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Méndez *et al.*, 2007). Esta lipasa ha sido aplicada en diversas reacciones de interés industrial como en la producción de ésteres de cadena corta (aromatizantes) (Ghamgui *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2004; Ben Salah *et al.*, 2007), en la resolución de mezclas racémicas (Palomo *et al.*, 2004), en la producción de lípidos estructurados (Nunes *et al.*, 2011), y en la producción de biodiesel (Ban *et al.*, 2001; Ciudad *et al.*, 2011).

La utilización de enzimas como catalizadores en procesos biotecnológicos para la producción de biodiesel, hasta hoy, representa un desafío prometedor. En este sentido, las lipasas provenientes de *Rhizopus oryzae* para la síntesis de FFAE, han sido estudiadas con diferentes formatos de aplicación. Si bien las enzimas comerciales, como Novozym 435, llevan la delantera en esta materia en términos de rendimiento (Xu *et al.*, 2003; Azócar *et al.*, 2010), existen desventajas económicas importantes que han motivado el desarrollo de nuevas líneas de investigación (Fukuda *et al.*, 2003).

## 2.4. Enzima inmovilizada

El uso de enzimas inmovilizadas resulta ventajoso al ser comparado con la aplicación de enzimas libres, debido a su estabilidad, reutilización, y porque el producto que se genera es de alta pureza, disminuyendo así los costos posteriores de purificación. Novozym 435 ha sido el catalizador enzimático comercial más investigado en procesos de transesterificación para la producción de FAAE, debido al alto rendimiento obtenido (Xu *et al.*, 2003; Azócar *et al.*, 2010).

Pessoa *et al.*, (2010) realizó un estudio cinético, en donde la conversión máxima del aceite de soja a FAME (Fatty Acid Methyl Ester) fue alcanzada en un reactor semicontinuo, adicionando secuencialmente cantidades estequiométricas de etanol a 25°C, con un 50% en peso de Novozym 435, y una proporción de etanol/aceite de 20,6:1 molar. Además, Xu *et al.*, (2006) llegó a un rendimiento de conversión de FAME de un 85%, en un tiempo de reacción superior a 18 horas, mientras que Royon *et al.*, (2007) obtuvo un rendimiento del 97% después de 24 horas a 50°C con Novozym 435 en presencia de *ter*-butanol.

Azócar *et al.*, (2010) demostró que al mezclar aceites de fritura, con los aceites de colza, aumenta el rendimiento de la reacción catalizada por Novozym 435, debido a que los aceites residuales contienen más monoacilgliceroles, diacilgliceroles y ácidos grasos libres (en comparación con el aceite de semilla de colza), que son sustratos más disponibles para la catálisis enzimática.

Iso *et al.*, (2001) investigó la actividad de las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* (Lipasa AK), *P. cepacia* (Lipasa PS), *Mucor javanicus* (Lipasa M), *Candida rugosa* (Lipasa AY) y *Rhizopus niveus* (Newlase F), inmovilizadas en partículas porosas inorgánicas de caolinita. La reacción se llevó a cabo con trioleína como materia prima, utilizando metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol como acil aceptores, con una relación molar de Alcohol/Lípido (A/L) de 3:1 [mol/mol], y en una reacción a 50°C. Para el caso de la lipasa inmovilizada PS, la conversión a oleato de propilo alcanzó sólo un 32%, y un 20% a oleato de butilo, después de 25 horas de reacción. Por

su parte, la lipasa AK alcanzó valores de conversión a FAAE superiores a 90% en 4 horas, utilizando 1-propanol. Además, *Pseudomonas fluorescens*, microorganismo productor de la lipasa AK, se ha reportado como una bacteria que presenta cierto grado de resistencia a solventes tóxicos, tales como el metanol, alcanzando 90% de conversión de FAAE con 4, 5 M equivalentes de metanol, en un tiempo de reacción de 24 horas.

A pesar de las ventajas de las lipasas inmovilizadas en comparación con las lipasas libres y los catalizadores químicos, su utilización industrial requiere de procesos complicados tales como la purificación, e inmovilización de las enzimas. Dichos procesos encarecen significativamente su valor (Fukuda *et al.*, 2003).

## **2.5 Inhibición de la lipasa por alcoholes de cadena carbonada corta**

En general, las lipasas catalizan las reacciones de manera eficiente cuando los sustratos son miscibles. Los alcoholes de cadena corta tales como el metanol pueden producir la pérdida de actividad de las enzimas, debido a la baja solubilidad de los alcoholes en el aceite. (Ban *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2004; Kaieda *et al.*, 2001). Alcoholes de cadena larga mayor a tres átomos de carbono pueden ser completamente disueltos en el aceite en una razón estequiométrica, es decir, cuando 3 moles de alcohol son disueltos en 1 mol de aceite. Sin embargo, la solubilidad del sistema metanol/aceite es solo 1,5/1 [mol/mol] y 2/1 [mol/mol] para la mezcla etanol/aceite (Shimada *et al.*, 2002).

Para llevar a cabo el proceso de transesterificación, generalmente se aplica un exceso de alcohol para inclinar la reacción hacia los productos. No obstante, este exceso promueve la inactivación de las lipasas por contacto con el metanol o etanol insoluble que permanece en emulsión con el aceite.

Varios enfoques han sido estudiados a fin de evitar la desnaturalización de la lipasa por efecto del alcohol, incluyendo su adición por etapas (Du *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2002), y el uso de

disolventes orgánicos (Li *et al.*, 2006) o una solución salina (Talukder *et al.*, 2008). Aunque estos enfoques parecen eficaces, son procesos laboriosos y poco prácticos para la producción a gran escala (Nakashima *et al.*, 2009).

Hama *et al.*, (2007) intentó resolver esta problemática utilizando las lipasas producidas por *R. oryzae*, inmovilizadas con el microorganismo *whole-cell* en partículas porosas de biomasa (Biomass Support Particles, BSPs), hechas de cubos de espuma de poliuretano (6mm x 6mm x 3mm) contenidas en un biorreactor de lecho empacado (Packed Bed Reactor, PBR), aplicando un flujo de recirculación continua de una emulsión lípido/metanol previamente sonicada. Sin embargo, el uso de un flujo alto para aumentar la transferencia de masa en la mezcla, causó la exfoliación de las células inmovilizadas en los soportes; mientras que aplicar flujos más bajos facilitó la formación de una capa hidrofílica con una alta concentración de metanol sobre las BSPs, disminuyendo significativamente la actividad lipasa.

El uso de enzimas libres a escala industrial es debatible, puesto que su rendimiento puede ser bajo, y su utilización resulta muy costosa, ya que además los problemas de inhibición y pérdida de actividad producidos por el contacto de las enzimas con alcoholes de cadena corta, han imposibilitado su reutilización. La forma más prometedora para aplicar lipasas en la reacción de producción de FAAE es utilizando las propias enzimas intracelulares o extracelulares de un Microorganismo Productor de Lipasas (Lipase Producing Microorganism, LPM), como catalizador *whole-cell*.

## **2.6. Microorganismo Productor de Lipasas (LPM) como catalizador *whole-cell***

Dados los antecedentes expuestos sobre las complicaciones del uso de enzimas libres, así como también aquellas inmovilizadas en distintas superficies, ha crecido el interés por estudiar la aplicación de una célula completa productora de lipasas como biocatalizador (catalizador *whole-cell*), que a diferencia de los casos anteriores, no requiere purificación o complicados procesos

de inmovilización, ya que la inmovilización se puede lograr de forma espontánea durante el cultivo en batch o por lote (Ban *et al.*, 2002). Diversos trabajos han demostrado las ventajas de la utilización directa de los microorganismos productores de lipasa (LPM) como catalizadores para evitar el alto costo de la inmovilización y purificación de enzimas (Fukuda *et al.*, 2003; Hama *et al.*, 2006; Devanesan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008).

La biocatálisis utilizando un LPM *whole-cell* promete desempeñar un papel importante en la síntesis industrial de productos químicos, productos farmacéuticos, y precursores para obtener productos por síntesis química. Sin embargo, el número de resultados exitosos mediante este proceso biotecnológico, ha sido hasta el momento muy reducido, debido a que existen varios factores que limitan su aplicación (Neumann *et al.*, 2005). Una limitación importante en la aplicación exitosa de células enteras en procesos biotecnológicos de síntesis química clásica, es que muchas reacciones de interés involucran sustratos o productos que son extremadamente tóxicos para los microorganismos (Van Sonsbeek *et al.*, 1993).

Este problema se puede resolver mediante la aplicación de un disolvente orgánico. Se ha utilizado con éxito ter-butanol, para aumentar la miscibilidad de la mezcla alcohol-aceite y la estabilidad del catalizador *whole-cell*, como demostraron Nikolova y Ward (1993). De la misma manera, Quin *et al.*, (2008) aplicó n-heptano a la reacción con *R. chinensis* alcanzando un 86% de FAAE.

El tiempo de reacción de este tipo de biocatálisis es mayor que en la catálisis química, dificultando su aplicación industrial. No obstante, dadas las ventajas medioambientales de esta biocatálisis en comparación con la catálisis química, es necesario continuar investigando en pro de obtener mejoras en el tiempo de reacción y el rendimiento de producción.

Los aspectos principales a resolver, para poner en práctica esta tecnología a escala industrial son: la inhibición por el alcohol, la baja miscibilidad de la mezcla de aceite-alcohol, baja transferencia de masa, y el tiempo de reacción. Sin embargo, el punto clave es la baja miscibilidad de la

mezcla de aceite-alcohol, ya que el alcohol insoluble provoca inhibición del microorganismo, en su actividad enzimática, una transferencia de masa pobre, y una reacción lenta.

A fin de resolver estas dificultades, Ciudad *et al.*, (2011) desarrolló un novedoso concepto de biorreactor multifase, utilizando *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell*, y aceite vegetal como materia prima para producir FAAE, en el cual obtuvo un 70% de rendimiento a temperatura ambiente, sin aplicar ningún pre-tratamiento ni procedimiento de inmovilización enzimática.

## **2.7. Biorreactor multifase para la producción de FAAE**

Los biorreactores multifásicos han demostrado un significativo potencial significativo para mejorar la productividad de muchos bioprocesos mediante la superación de los problemas de solubilidad y toxicidad del sustrato (Torres *et al.*, 2009). Heipieper *et al.* (2007) afirman que las biotransformaciones en sistemas con diferentes fases, permiten el transporte de sustratos y de productos de una fase a la otra, manteniendo el equilibrio y disminuyendo simultáneamente el efecto inhibitorio de los productos o reactivos, a diferencia de un sistema con una sola fase. Los sistemas multifásicos tienen la ventaja de ser auto-reguladores facilitando así el flujo dinámico de nutrientes requeridos para la actividad metabólica de las células.

Este tipo de sistema ha sido utilizado principalmente en el tratamiento de aguas residuales (Torres *et al.*, 2009; Prasanna y Pydi, 2008; Zhu *et al.*, 2000), y en las biotransformaciones en sistemas de dos fases con catalizadores *whole-cell* (Heipieper *et al.*, 2007; Rehm, 2007). Por lo tanto, esta tecnología podría resolver muchos de los problemas de inhibición causados por el alcohol en la biocatálisis para la producción de FAAE.

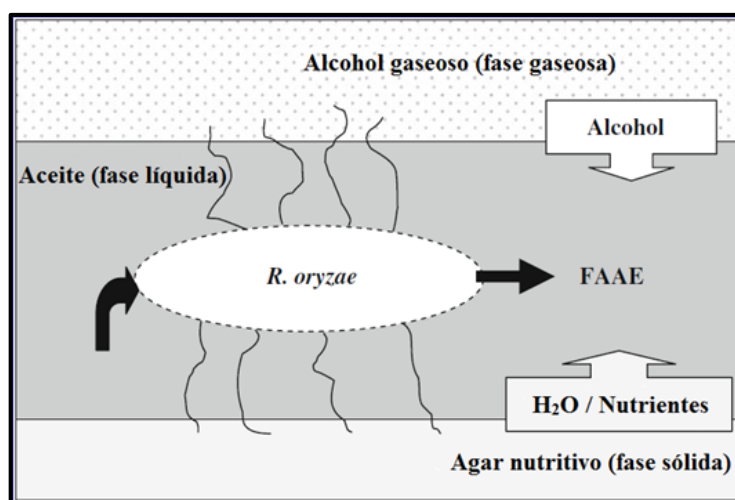
Heipieper *et al.*, (2007) señalan que las biotransformaciones a partir de *whole-cells* (o células completas) suelen ser más ventajosas que en los sistemas enzimáticos tradicionales, ya que

confieren una ventaja competitiva en las conversiones con materias primas complejas, que involucran múltiples reacciones enzimáticas.

En este sentido, Ciudad *et al.* (2011) desarrollaron un nuevo concepto de biorreactor multifásico (Figura 3) para evitar parcialmente el efecto del alcohol sobre la inhibición de *Rhizopus oryzae*, microorganismo utilizado como catalizador *whole-cell* para la producción de FAAE desde aceite de colza. Las tres fases se disponen de la siguiente forma dentro de una placa Petri: una superficie sólida compuesta de medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo *whole-cell*, una fase líquida correspondiente al aceite, y una fase gaseosa saturada de metanol. La fase líquida del aceite, permite el transporte difusivo de alcohol entre la fase gaseosa (ambiente saturado con alcohol) y la fase de aceite (baja concentración de alcohol), además, se propicia un transporte difusivo de agua y nutrientes entre el medio de cultivo (alta concentración) y el aceite líquido (baja concentración). Esta dinámica mantiene los nutrientes, el agua, y el aceite, biodisponibles para el crecimiento de LPM, y promueve al mismo tiempo la producción de FAAE.

La transferencia de masa en este tipo de sistema, es probablemente también reforzada por la presencia de las hifas de *R. oryzae*, que conectan directamente las diferentes fases. Por otro lado, la fase oleosa líquida podría actuar como una capa protectora ante la toxicidad del alcohol. Probablemente, *R. oryzae* utiliza el alcohol necesario para la producción de FAAE sólo por transporte difusivo lo que indica que el aceite se utiliza para el crecimiento de *R. oryzae* y para la conversión a FAAE.





**Figura 3.** Concepto de biorreactor multifase con un catalizador *whole-cell* para la producción de FAAE. Modificado de Ciudad *et al.*, (2011).

De acuerdo con estos resultados, la aplicación de este sistema multifase para la producción de FAAE, donde el catalizador es una célula entera que se mantiene viva y activa, es una potencial alternativa a la utilización de lipasas comerciales. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para su aplicación a escala industrial. En este sentido, la investigación futura debería centrarse en mejorar el transporte de alcohol gaseoso y evaluar su efecto sobre los catalizadores de células completas y rendimiento de FAAE. Sin embargo, el punto más importante es evaluar el rendimiento del sistema multifase utilizando material complejo bruto, tal como el aceite de microalgas.

## 2.8. Aceite de microalgas como materia prima para la producción de FAAE

Las microalgas corresponden a un conjunto de microorganismos unicelulares, generalmente fotosintéticos, filamentosos (forman cadenas, colonias, o cenobios), y cuyas células funcionan independientemente. Las microalgas pueden utilizar CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y luz solar como energía para acumulación de aceite en determinadas condiciones ambientales (Li *et al.*, 2008). La acumulación de aceite dependerá de cada especie y sus condiciones de cultivo, así como el pH, la salinidad, las fuentes de nitrógeno (Li *et al.*, 2008), y la intensidad de la luz, siendo considerados estos dos últimos como parámetros fundamentales (Solovchenko *et al.*, 2008).

Estos microorganismos pueden crecer fotoautotróficamente o heterotróficamente, aquellas que son heterótrofas producen más ácidos grasos, ya que el uso de una fuente de carbono orgánica resulta en una mayor producción de biomasa y mayor acumulación de lípidos en la célula en comparación con el crecimiento autotrófico (Xu *et al.*, 2006; Miao y Wu, 2006).

Se ha reportado que muchas microalgas, tales como: *Botryococcus braunii*, *Chlorella* sp., *Cryptocodinium cohnii*, *Cylindrotheca* sp., *Dunaliella primolecta*, *Isochrysis* sp., *Monallanthus salina*, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Schizochytrium* sp., y *Tetraselmis sueica*, pueden acumular aceites (Chisti, 2007). Entre ellas, destacan *Botryococcus braunii* y *Nannochloropsis gaditana*, que han sido ampliamente estudiadas debido a su alto contenido de lípidos, alcanzando un 30-40% y 45-55%, respectivamente.

*B. braunii* es una especie que se caracteriza por ser capaz de excretar hidrocarburos a las capas externas de la pared celular, generando grandes concentraciones de lípidos altamente saturados y complejos, principalmente hidrocarburos, ácidos grasos, polímeros y ceras. En el caso del aceite de *N. gaditana*, el contenido de ácidos grasos está constituido principalmente por ácido palmítico y ácido palmito oleato, a diferencia de *B. braunii* que es principalmente ácido oleico. No

obstante, el alto índice de acidez ( $> 8,97$  mg KOH/g) de estos aceites dificulta el uso de un catalizador químico tradicional para la producción de biodiesel (Xu *et al.*, 2006). Por otra parte, las microalgas han presentado algunos problemas asociados a sus condiciones de crecimiento en sistemas de biorreactores, considerando sus requisitos de luz y las grandes superficies requeridas para su cultivo (Vicente *et al.*, 2009).

De acuerdo a Samori *et al.* (2009), las complicaciones de la producción de biocombustibles a partir de microalgas, tienen un costo total más alto en comparación con los combustibles fósiles, ya que la operación de estanques abiertos y biorreactores de cultivo son costosos, y la recolección de la biomasa de microalgas requiere grandes cantidades de energía. Además, el paso crítico en el desarrollo de biodiesel a partir de microalgas es la extracción de lípidos, por ello, la tecnología de extracción de aceite se debe mejorar, y probablemente ser redefinida a fin de hacer de éste un proceso competitivo.

A pesar de numerosas investigaciones sobre el cultivo de microalgas como materia prima para la producción FFAE, son pocos los estudios enfocados directamente a la síntesis de FFAE. Miao y Wu (2006) utilizaron cultivos celulares de *Chlorella protothecoides* con alta acumulación de lípidos (55%), alcanzando hasta un 60% de conversión a FFAE en catálisis ácida (ácido sulfúrico en proporción 1/1 p/p ácido/lípidos), sin embargo para lograr ese resultado fue necesaria una alta adición de metanol en una proporción de 56:1. Umdu *et al.* (2009) consiguieron un 98% de FFAE utilizando aceite extraído de *Nannochloropsis oculata*, en cuyos ensayos se aplicó un catalizador heterogéneo ( $Al_2O_3$  impregnado con CaO y MgO) a 50 °C, y una incorporación de metanol en relación molar de metanol/lípido 30:1 [mol/mol].

En el caso de la utilización de aceite de microalgas para la producción de biodiesel, aplicando catalizadores enzimáticos, trabajos realizados por Xiong *et al.* (2008) revelaron conversiones de hasta un 98% de FFAE usando aceite de *Chlorella protothecoides*, y aplicando lipasas de *Candida sp.*, en 12 horas de reacción; no obstante, fue necesario utilizar lipasas inmovilizadas en resinas macroporosas en un 75% p/p. Para el caso de los catalizadores *whole-cell*, Xiao *et al.*,

(2010) exploraron la utilización de lipasas inmovilizadas de *Aspergillus niger* en partículas porosas de biomasa (BSPs), y aceites extraídos de la microalgas *Nannochloropsis sp.* y *Chlorella*, consiguiendo conversiones de un 68.2% y 50.3%, respectivamente.

Considerando estos antecedentes, la producción biotecnológica de FAAE a partir de aceite de microalgas es una tecnología incipiente y no ha sido suficientemente explorada. Actualmente, no existen investigaciones previas que reporten el uso de este tipo de materia prima en procesos que apliquen un LPM como catalizador *whole-cell* para la producción de FAAE.

### 3. HIPÓTESIS

La utilización de *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* en un biorreactor multifase, hace factible la producción de biodiesel utilizando aceite de microalgas como materia prima.

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar la factibilidad técnica de utilizar *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* para producir biodiesel en un biorreactor multifase a partir de aceite extraído de dos especies de microalgas.

#### 3.2. Objetivos específicos

Determinar las condiciones de operación para la producción de biodiesel utilizando *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* en un biorreactor multifase a partir de aceite de dos especies de microalgas y dos acil aceptores.

Evaluar la reutilización de *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* luego de un ciclo de producción de biodiesel.

## 4. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biocombustibles y Materiales correspondiente al Center of Waste Management and Bioenergy, ubicado en las dependencias del Núcleo Científico Tecnológico en Biorecursos (BIOREN) en la Universidad de La Frontera, Temuco.

### 4.1. Material biológico y condiciones de cultivo

La cepa del hongo *Rhizopus oryzae* 4697 fue adquirida desde NBRC cultures, Japón. Para sustentar el crecimiento del hongo, este fue replicado en un stock utilizando un medio de cultivo sólido modificado por Ciudad *et al.*, 2011 (70 g/L peptona, 1 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O y 1.5 % agar), ajustado a pH 7,4. Todo el stock utilizado en el diseño experimental se mantuvo a 25°C para su crecimiento por 7 días en 1,5 mL de aceite vegetal esparcido sobre el medio de cultivo sólido con ayuda de una espátula, esto a fin de proporcionar otra fuente de carbono, y simultáneamente estimular la producción de lipasas. Posteriormente, las placas completamente colonizadas fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización en los diferentes ensayos.

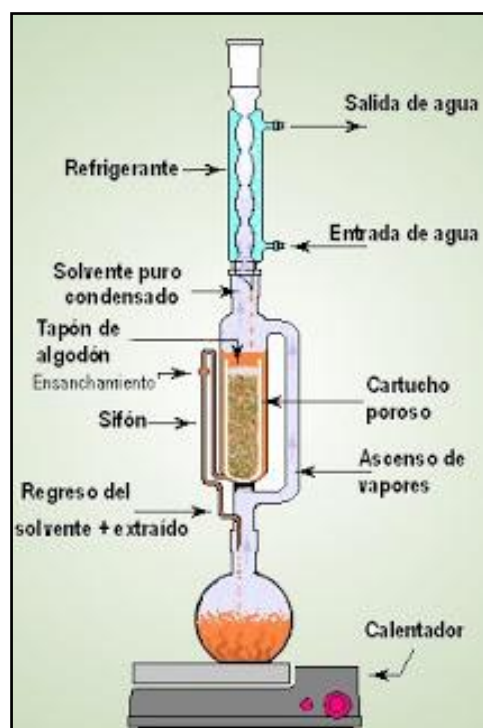
**4.1.1. Microalgas.** La biomasa microalgal fue obtenida desde la Universidad de Antofagasta, lugar en donde es cultivada, cosechada, y centrifugada hasta obtener aproximadamente un 20% en materia seca. Luego, la microalga es envasada al vacío y congelada para ser transportada hasta el laboratorio de Biocombustibles y Materiales, manteniendo la cadena de frío. Una vez recibidas en el laboratorio, son almacenadas a -20°C hasta su posterior utilización.

## 4.2. Extracción de lípidos de microalgas por método Soxhlet con éter de petróleo.

Dos aceites de diferentes especies de microalgas, *Botryococcus braunii* y *Nannochloropsis gaditana*, fueron utilizados a fin de evaluar la robustez y versatilidad del catalizador *whole-cell* frente a distintos sustratos.

La biomasa microalgal fue obtenida desde la Universidad de Antofagasta, con aproximadamente un 20% en materia seca. La extracción de lípidos se realizó según el método de Apha (1998) mediante Soxhlet (Figura 4), sistema ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas y lípidos en general. Para ello, 25g de microalga seca y molida fueron pesados en un dedal de celulosa, se tapó con papel filtro, y una vez cerrado fue insertado al tubo del sistema Soxhlet. Luego, se incorporaron 350 mL de éter de petróleo en un balón de 500 mL con 6 perlas de vidrio para controlar la ebullición, esto se ensambló al Soxhlet, y se conectó a un condensador; en el cual, después de evaporarse, el solvente orgánico se condensa y cae al tubo Soxhlet, donde extrae el aceite contenido en la biomasa seca hasta que el tubo se llena. Cuando el tubo está lleno de solvente, este, por medio de un sifón, vuelve al balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso durante 16 horas, con el manto calefactor a 65°C.

La fracción lipídica fue concentrada por rotaevaporación, y almacenada a 4°C en frascos ámbar para evitar su oxidación por efecto de la luz y temperatura. El solvente fue recuperado para su posterior reutilización.



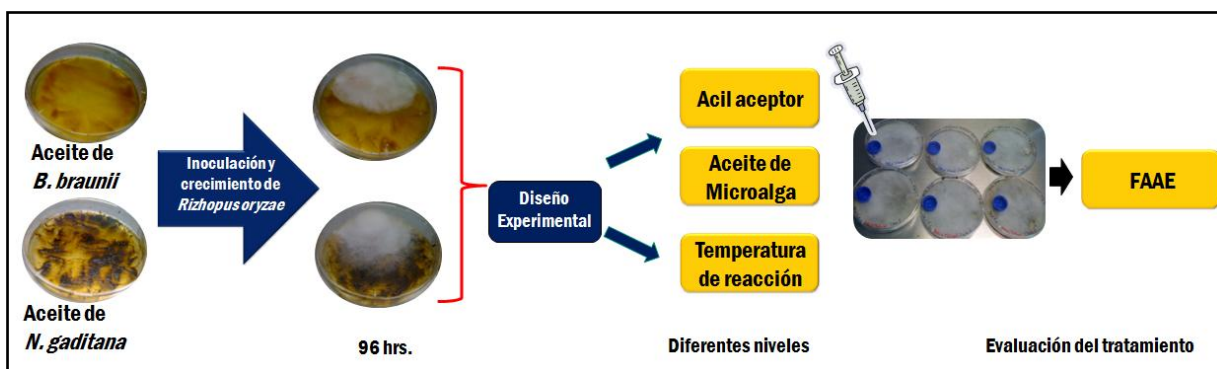
**Figura 4.** Esquema conceptual del sistema Soxhlet. Imagen tomada de Nuñez, (2008).

**4.2.1. Obtención de la fracción de ácidos grasos transesterificables en los aceites de microalgas.** De acuerdo al método de Araujo (1995), se hidrolizaron 100  $\mu\text{L}$  de aceite en tubos de ensayo de tapa rosca, con 2 mL de KOH/ MeOH 0,5 M, dejando incubar en un vaso precipitado con agua a 100°C por 5 minutos, sobre una placa calefactora. Una vez hidrolizado, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de HCL/MeOH (4/1 v/v) y se incubó a 100°C por 15 min, se dejó enfriar y se agregaron 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada para facilitar una clara separación de las fases. Posteriormente, 3 mL de éter de petróleo fueron incorporados a las muestras, se agitaron brevemente los tubos, y se dejó reposar durante 1 minuto. Se extrajo el sobrenadante correspondiente a la fracción metilada contenida en los 3 mL de éter de petróleo, se traspasó a otro tubo, y se repitió la extracción sobre el resto del metilado, por medio de un segundo lavado con otros 3 mL de éter de petróleo. Previo a la inyección en GC-MS, las muestras se mantuvieron por 72 horas bajo campana de extracción hasta la evaporación total del solvente.



### 4.3. Inoculación al biorreactor multifase

Para la preparación de los ensayos en los biorreactores multifase (Figura 5), se prepararon placas Petri con el medio de cultivo citado anteriormente. Luego, se agregó 250  $\mu\text{L}$  de aceite de microalga sobre el medio de cultivo sólido utilizando un aza de vidrio. Para la inoculación del sistema, se cortaron porciones de 1 cm de diámetro desde las placas de stock, y fueron dispuestas en las placas con distintos aceites. Posteriormente los biorreactores fueron incubados durante 96 horas a 20°C para favorecer el crecimiento del hongo en las placas; pasado este tiempo, se adicionaron otros 250  $\mu\text{L}$  de aceite de microalga sobre el hongo, y una vez completa esta etapa se comenzó con la primera dosis de alcoholes de acuerdo al tipo de aceptor acilo, proporción respecto al aceite, y temperatura de incubación correspondiente al respectivo tratamiento en triplicado. La recarga de alcohol se realizó con una jeringa cada 24 horas hasta completar 4 dosis en total, y el tiempo de incubación a la temperatura para cada ensayo se estableció en 165 horas.



**Figura 5.** Diseño del proceso para la preparación de los sistemas multifase de acuerdo a cada tratamiento.

#### 4.4. Condiciones operacionales del biorreactor multifase y diseño experimental

Para determinar la mejor condición operacional y el mejor aceite de microalga para producir FAAE, se aplicó una metodología factorial. El diseño experimental (Tabla 2) consistió en 4 variables, temperatura (20, 30, y 40°C), tipo de aceptor acilo (metanol y etanol), tipo de aceite de microalga (*Botryococcus braunii*, y *Nannochloropsis gaditana*), y proporción de Alcohol/Lípido (4/1, 8/1, 12/1 [mol/mol]), cuyos rangos experimentales fueron escogidos previamente a través de experimentos exploratorios.

**Tabla 2.** Tratamientos ensayados en el estudio de las condiciones operacionales para la producción de FAAE, utilizando *R. oryzae* como catalizador *whole-cell*.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Proporción Alcohol/Lípido [mol/mol]
1 A	20	4:1
2	30	4:1
3	40	4:1
1 B	20	8:1
1 C	20	12:1

Los resultados fueron comparados según los rendimientos de reacción y la productividad de FAAE. Todas las experiencias se realizaron en triplicado.

**4.4.1. Cinética de la reacción.** Para estudiar la formación de diferentes productos, y la cantidad de horas requeridas para el proceso de conversión, se realizó un set de experimentos por triplicados y en destructivo. Esto fue evaluado cada 24 horas hasta completar un total de 5 muestreos durante el tiempo anteriormente establecido para la reacción.

La hidrólisis de los diferentes aceites fue determinada por la medición del Índice de Acidez (I.A) y contenido de FFA (Free Fatty Acid), mientras que la ocurrencia de esterificación fue evaluada

en términos del comportamiento de la concentración de FFA, considerando que una disminución del contenido de FFA indica su esterificación a FAAE.

#### 4.5. Toma de muestras

Al finalizar cada experimento, las muestras fueron extraídas utilizando 15 mL de éter de petróleo sobre la placa, se realizó un barrido con un aza de vidrio, y el contenido fue almacenado en un tubo de ensayo de tapa rosca utilizando una pipeta Pasteur. Debido al arrastre de residuos y trazas del microorganismo, las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m durante 6 minutos, y el sobrenadante fue traspasado a un tubo de ensayo cuyo peso ha sido previamente registrado. El solvente de las muestras fue evaporado bajo campana de extracción durante 48 horas para su posterior análisis en cromatografía gaseosa.

#### 4.6. Determinación del Índice de Acidez (I.A)

Para la determinación del índice de acidez, se neutralizaron 200 mL de alcohol en ebullición mediante la adición de NaOH 0,1 M; como indicador se agregó Fenolftaleína (3 gotas aprox.). Luego, se pesaron aproximadamente 100 mg de aceite en un tubo de ensayo, y esto fue disuelto en 2 mL del alcohol previamente neutralizado. Una vez que el aceite se encontró completamente homogeneizado en el alcohol con ayuda de una barra magnética, se tituló en presencia de fenolftaleína, usando NaOH 0,02 M y agitando constantemente hasta alcanzar el punto de equivalencia, es decir, momento que una gota produce un cambio de color ligero pero evidente, que persiste al menos por 30 segundos. Los resultados fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$I.A = \frac{V \cdot C \cdot M}{P}$$

Donde:

*I.A* = índice de acidez (mg NaOH/g de aceite)

*V* = volumen solución valorada de NaOH utilizada (mL)

$C = \text{peso molecular NaOH (40g/mol)}$

$M = \text{molaridad de solución de NaOH utilizada (mol/L)}$

$P = \text{peso en gramos de muestra utilizada (g)}$ .

Finalmente, la producción de FAAE fue determinada por el contenido de esteres metílicos presentes en las muestras.

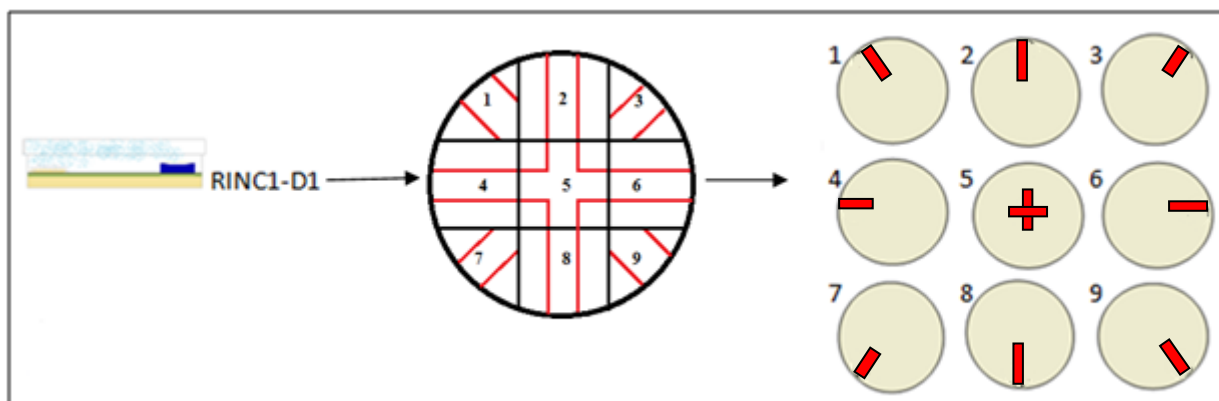
#### **4.7. Detección y cuantificación de FAAEs por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS)**

Se identificó y cuantificó el porcentaje de FAAE presentes en la muestra, mediante cromatografía en fase gaseosa. Se preparó como estándar interno una solución de concentración conocida de metil heptadecanoato, utilizando n-heptano como solvente (2000 mg/L). Posteriormente, se pesaron 8 a 15 mg de muestra en viales para cromatografía, se añaden 233  $\mu\text{L}$  de estándar interno, y 926  $\mu\text{L}$  de n-heptano; se tapó el vial y se agitó en vórtex por 30 segundos para homogeneizar. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla utilizando helio como gas carrier, en un cromatógrafo de gases Clarus 600, acoplado a espectrómetro de masa Clarus 500T de Perkin Elmer (GC/MS), con una columna capilar Elite 5-MS (95% difenil-5% dimetil), de 30 m de largo, 0,1  $\mu\text{m}$  de espesor y diámetro interno de 0,25 mm. El programa de temperatura fue el siguiente: 50°C por 1 minuto, calentando hasta 187°C a una tasa de 1,1 °C/min. Temperatura del inyector 250°C.

#### 4.8. Determinación de viabilidad para la reutilización del catalizador *whole-cell*

A fin de determinar la factibilidad de la reutilización de *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* en la producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas en el biorreactor multifase, se realizaron dos tipos de experimentos: a) Re-inoculación del microorganismo al final del ciclo de producción de biodiesel, en una nueva placa con medio de cultivo; b) Reutilización del catalizador *whole-cell* al final del ciclo de producción de biodiesel, incorporando nuevo sustrato en el mismo sistema.

**4.8.1. Re-inoculación del catalizador *whole-cell*.** Se estudió la factibilidad de re-colonización del catalizador *whole-cell*, realizando un muestreo en 9 zonas de la placa luego de un ciclo de producción de biodiesel durante 96 horas, con etanol como aceptor acilo y aceite de *N. gaditana* y en proporción 8/1 [mol/mol]. Estos 9 inóculos fueron re-ubicados en 9 placas Petri con medio de cultivo (Figura 6), este experimento se realizó en duplicado, y el crecimiento fue observado durante 7 días.



**Figura 6.** Experimentos de re-inoculación del catalizador *whole-cell* (RINC).

**4.8.2. Reutilización del catalizador *whole-cell*.** Se estudió la factibilidad de re-colonización del catalizador *whole-cell*, quitando la fuente de alcohol de la placa Petri, luego de completar un ciclo de producción de biodiesel durante 96 horas, con etanol como aceptor acilo y aceite de *N. gaditana* en proporción 8/1 [mol/mol] racionado en 4 dosis de 1 mL cada 24 horas. Una vez terminado el ciclo, se esperó la evaporación del alcohol residual condensado en la placa Petri durante 24 horas, posteriormente se agregaron otros 250  $\mu$ L de aceite de *N. gaditana*, esparcidos con un aza de vidrio. Este experimento fue realizado en triplicado, el crecimiento fue observado durante 96 horas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Contenido de lípidos transesterificables en los aceites de microalga

A fin de determinar el rendimiento máximo teórico de FAAE a obtener, se determinó el perfil de ácidos grasos de las microalgas *Botryococcus braunii* (Bb) y *Nannochloropsis gaditana* (Ng). Para ello, se procedió con la metilación de los lípidos de las microalgas, extraídos mediante el sistema Soxhlet, a partir de esto, se obtuvo la fracción de lípidos transesterificables en cada especie de microalga. La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Generalmente, los lípidos producidos por las microalgas incluyen lípidos neutrales, polares, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos, y pigmentos (carotenoides, clorofilas, etc); estos lípidos pueden ser agrupados en dos categorías: los lípidos de almacenamiento o no polares, y los lípidos estructurales o polares. Estos últimos se encuentran principalmente como triglicéridos, compuestos principalmente por ácidos grasos saturados e insaturados, con moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, las cuales pueden ser transesterificadas para producir biodiesel.

Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes en microalgas, sin embargo moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en ciertas especies. Thomas *et al.*, (1984) reportó la abundancia relativa de ciertos ácidos grasos asociado a especies específicas, destacando entre otros, el contenido de C20:5 para *Nannochloropsis* sp. en comparación con otras cepas. Esto guarda relación con la diferencia expresada para el ácido eicosapentaenoico en el perfil de ácidos grasos para *Nannochloropsis gaditana* y *Botryococcus braunii*, con los cuales a partir de la metilación y posterior cuantificación por cromatografía gaseosa, se obtuvo un 10,4 y 0,86%, respectivamente.

Las claras diferencias en el perfil de ácidos grasos para las especies *Botryococcus braunii* (Bb), y *Nannochloropsis gaditana* (Ng), pueden derivar en distintos efectos para las características del

FAAE producido. Los estándares usualmente utilizados como referencia son la norma ASTM D6751 en EUA y las normas europeas EN 14213 (biodiesel para calefacción) y EN 14214 (biodiesel para uso vehicular). El cumplimiento de tales disposiciones precisa de biodiesel enriquecido en ácidos grasos de cadena larga con elevado grado de saturación, es decir, preferentemente los ácidos palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) y mirístico (C14:0), que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (Knothe, 2005; Chisti, 2007; Schenk *et al.*, 2008). En este sentido rendimiento máximo teórico de FFAE reflejado en el perfil de ácidos grasos, indica una relevante ventaja en los resultados obtenidos a partir de los lípidos contenidos en *N. gaditana*, sobre aquellos en *B. braunii*, en los cuales se observó un 14,54 y 4,94% para C16:1; un 5,18 y 29,87% para C18:1; y por último, un 0,6 y 5,05% para C14:0, respectivamente.

**Tabla 3.** Contenido de lípidos transesterificables en los aceites obtenidos por método Soxhlet para las microalgas *B. braunii* y *N. gaditana*

Fórmula CN:DB	Nombre común	FAME (%)	
		Aceites de Microalga	
		<i>B. braunii</i>	<i>N. gaditana</i>
C14:0	Ácido mirístico	0,06	5,05
C16:0	Ácido palmítico	1,63	13,42
C16:1	Ácido palmitoleico	4,94	14,54
C18:2n-6	Ácido linoleico	2,06	1,02
C18:1n-9cis	Ácido oleico	29,87	5,18
C18:1n-9trans	Ácido elaidico	0,65	0,15
C18:0	Ácido esteárico	0,11	0,50
C20:4n-6	Ácido araquidónico	0,19	2,13
C20:5n-3	Ácido todo cis (5,8,11,14,17) eicosapentaenoico	0,86	10,04
<b>Fración transesterificable total</b>		<b>40,38%</b>	<b>52,02%</b>

\*CN:DB = Número de átomos de carbono de los grupos acilo del triacilglicerol : Número de dobles enlaces.



En las especies dulceacuícolas, como *Botryococcus braunii*, prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción los compuestos poli-insaturados (Polysaturated Fatty Acids, PUFAs). Por el contrario, en especies marinas como *Nannochloropsis gaditana*, los PUFAs pueden en algunos casos llegar a constituir la mayor fracción de ácidos grasos.

Knothe (2005), aclaró que un perfil de ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación, es deseable para la elaboración de biocombustible de calidad. En este sentido, pese a la ventaja dada por la fracción transesterificable total de *N. gaditana* sobre *B. braunii* (52,02 y 40,38%, respectivamente), los altos valores mostrados para los compuestos poli-insaturados en *N. gaditana* constituyen un perjuicio para la calidad del producto final.

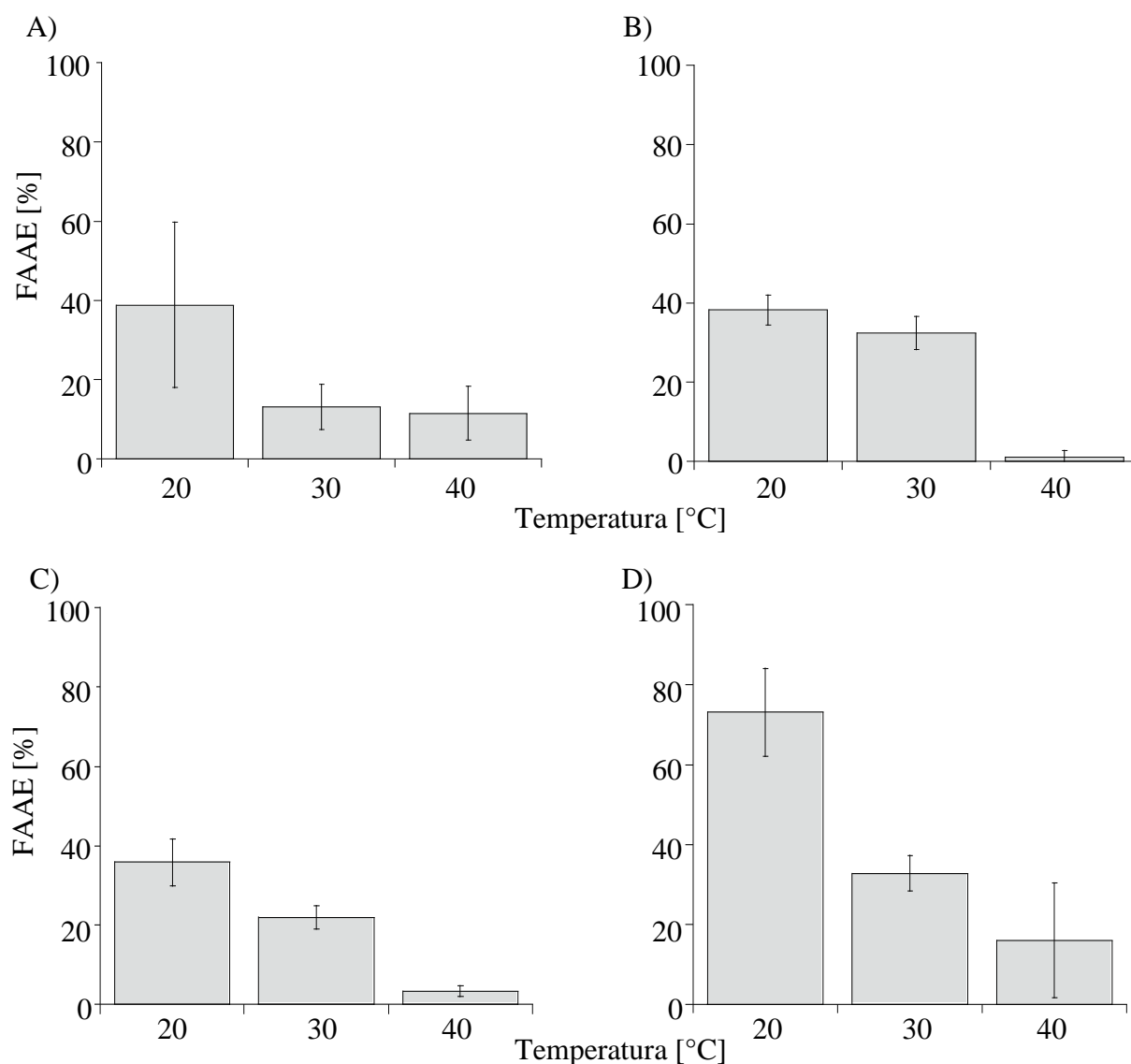
## 5.2. Condiciones de operación para la producción de biodiesel utilizando *R. oryzae* como catalizador *whole-cell* en un biorreactor multifase.

Con el objetivo de determinar las condiciones de operación para un biorreactor trifásico, utilizando *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell*, para la síntesis de FAAE a partir de aceite de microalgas, se estudiaron diferentes variables del sistema. En primera instancia, fueron estudiados tres niveles de temperatura, utilizando *N.gaditana* y *B. braunii* como materia prima, y dos aceptores acilo (metanol y etanol), en una razón molar de alcohol lípido 4:1 [mol/mol]. Esto, a fin de explorar la tendencia del factor temperatura con respecto a la producción de FAAE.

Los resultados correspondientes a los experimentos exploratorios para la selección de temperatura (Figura 7), revelaron una clara tendencia a disminuir el porcentaje de FAAE conforme se aumenta la temperatura de reacción. El rendimiento máximo, fue obtenido a 20°C, utilizando aceite de *N. gaditana* como materia prima alcanzando hasta un 73,1% de FAAE al incluir etanol como aceptor acilo; esto, seguido por una conversión de 38,8% al reemplazar el aceptor acilo por metanol. Carrillo *et al.*, (2007) modelaron el crecimiento de *Rhizopus oryzae* en distintas condiciones y temperaturas, sugiriendo finalmente que el crecimiento de este hongo se ve favorecido a 20°C considerando condiciones muy similares a las utilizadas en este estudio. En consecuencia, el hecho de establecer un ambiente favorable para el microorganismo, con una baja y lenta tasa de evaporación de alcohol, permitió que éste pudiese utilizar los triglicéridos como fuente de carbono pese a tratarse de un sustrato cuya composición es bastante compleja, estimulando así la producción de lipasas para acceder a moléculas simples, que en paralelo son esterificadas para la síntesis de FAAE.

Los bajos valores de conversión a biodiesel, obtenidos al aumentar la temperatura del proceso a 30°C y a 40°C, indican que la maquinaria metabólica del microorganismo y en específico la actividad lipasa, se ven afectadas negativamente, observándose una disminución consecutiva del contenido de FAAE. Esto sugiere que el incremento de la temperatura en el proceso implicó un

brusco aumento en la tasa de evaporación del alcohol contenido en el sistema, elevando su concentración en la fase gaseosa, y en efecto, probablemente intensificando la toxicidad en el medio para el microorganismo e inhibiendo su actividad lipasa por desnaturalización. Esta misma lógica, también explica la diferencia que representó la baja en el rendimiento al aplicar metanol, compuesto cuya naturaleza química le confiere una mayor presión de vapor con respecto al etanol, correspondiente a 127 y 59 hPa, respectivamente (valores a una temperatura de 20°C).



**Figura 7.** Rendimiento de FAME para diferentes temperaturas, con una razón molar Alcohol/Lípido (A/L) de 4:1 [mol/mol]. A) Aceite de *B. braunii*, metanol como aceptor acilo; B) Aceite de *B. braunii*, etanol como aceptor acilo; C) Aceite de *N. gaditana*, metanol como aceptor acilo; D) Aceite de *N. gaditana*, etanol como aceptor acilo.

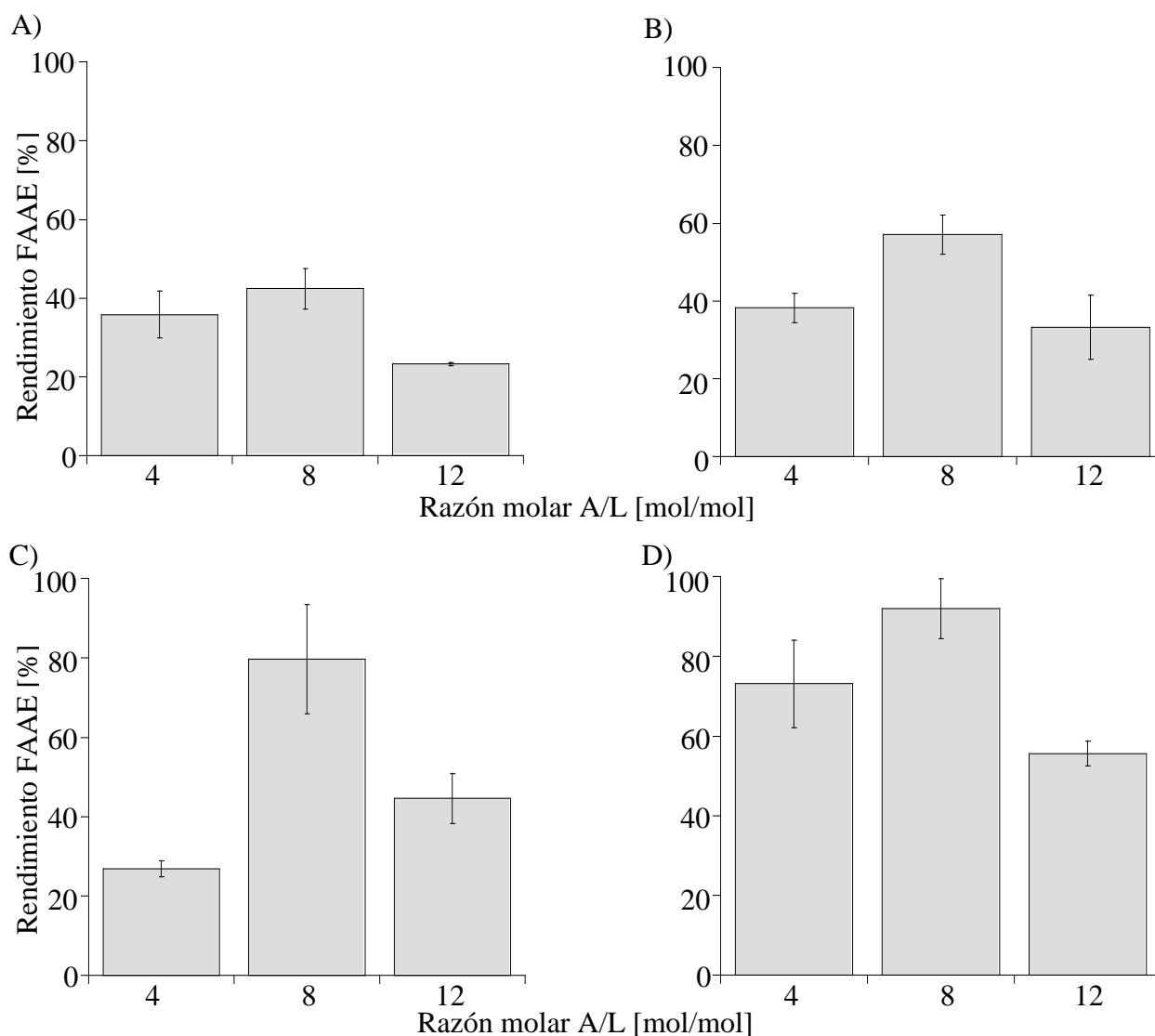
**5.2.1. Efecto de la variación de la concentración de alcohol en el rendimiento de FAAE.** Se investigó el efecto de distintas razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol] en el rendimiento de FAAE. Para ello, se utilizó el mejor nivel de temperatura determinado a partir del experimento anterior (20°C), y fueron aplicados tres niveles para la concentración de alcohol, 4/1, 8/1, y 12/1 [mol/mol], se mantuvo tratamientos por separado de etanol y metanol como aceptores acilo, en combinación con los distintos aceites de microalgas (Figura 8).

Diversos autores han reportado que una razón molar óptima para la producción de biodiesel se encuentra en 6/1 [mol/mol], mientras que Leung y Guo (2006) demostraron obtener un máximo de conversión a FAME al utilizar una concentración de 7/1 [mol/mol]; por su parte Phan y Phan (2008), advirtieron incrementos en el rendimiento de FAME hasta una razón 8/1, conversión que disminuía para razones sobre 12/1. No obstante, cabe mencionar que en estas investigaciones se utilizó aceites residuales de canola como materia prima, metanol como aceptor acilo, y catalizadores alcalinos. Dicho esto, en los casos anteriormente mencionados, la reducción del rendimiento para altas concentraciones de metanol se podría originar debido a que el exceso de metanol interferiría en la separación de los ésteres producidos, por un incremento de la solubilidad del glicerol (Encinar *et al.*, 2007).

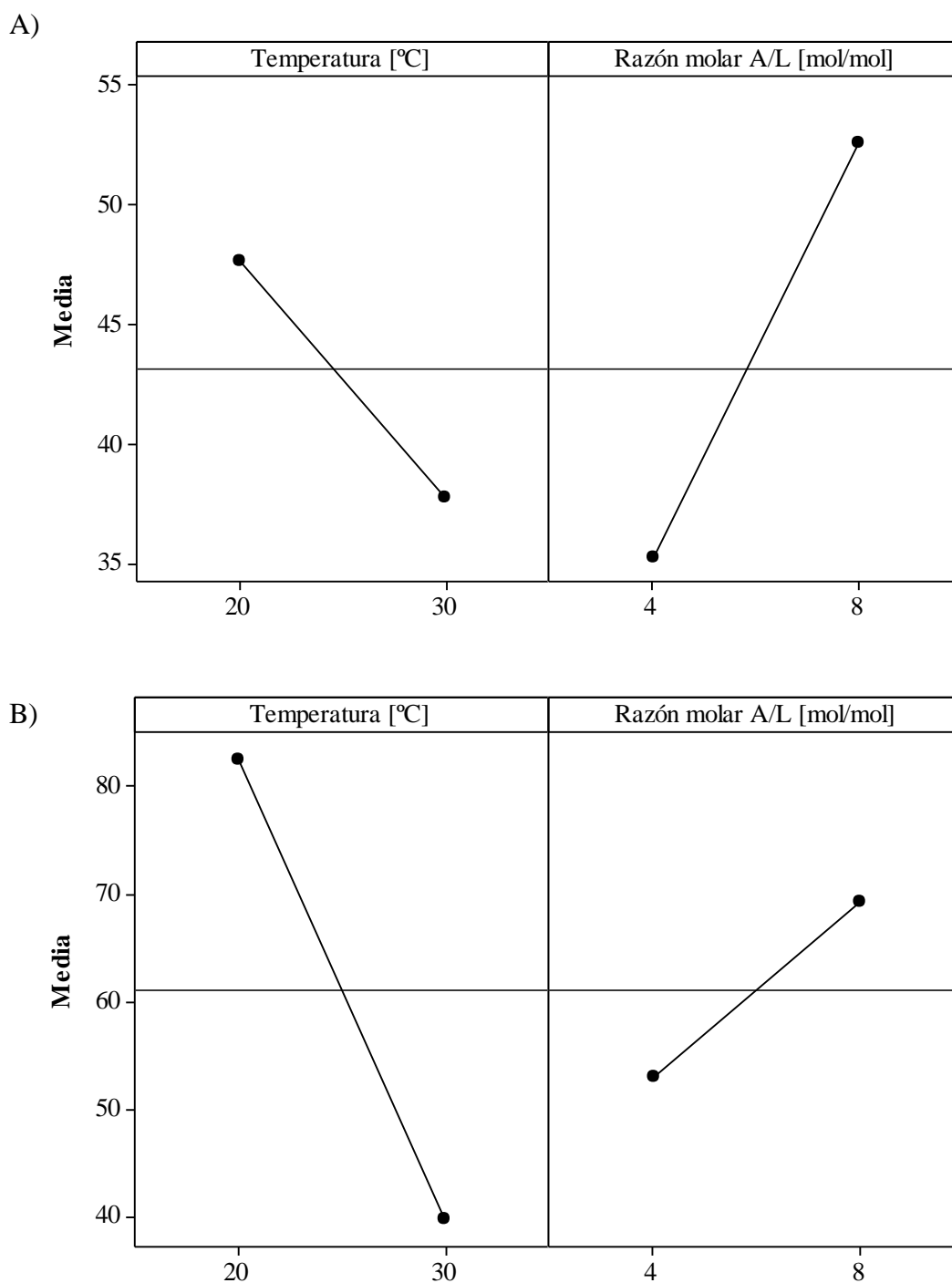
En cuanto al efecto de la dosis de alcohol, de acuerdo al sistema y catalizador utilizado en la presente investigación, se distinguió una clara tendencia (Figura 9), favoreciendo la eficiencia del proceso hasta una razón molar alcohol/lípido 8/1 [mol/mol], indicando que el sistema necesita de una cantidad adecuada de alcohol para favorecer el proceso de transesterificación o esterificación de los aceites, permitiendo establecer cierta analogía con los resultados mostrados por Phan y Phan (2008).

Esto sugiere que el proceso de producción de FAAE utilizando *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell*, y aceite de microalgas como materia prima, tendría en este sentido, un funcionamiento bastante competitivo al ser comparado con un proceso químico con materias primas convencionales. Más aún, si consideramos que al reemplazar este tipo de materias primas

por aquellas alternativas como el aceite de microalgas junto a la aplicación de catalizadores heterogéneos ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  impregnado con  $\text{CaO}$  y  $\text{MgO}$ ) (Miao y Wu , 2006), o catálisis ácida (ácido sulfúrico en proporción 1/1 p/p ácido/lípidos) los autores reportaron requerir un exceso de alcohol en la reacción, necesitando desde una razón molar A/L de 30:1 [mol/mol] al utilizar sales como catalizador para conseguir un 98% de FFAE, hasta una razón A/L 56:1[mol/mol] para alcanzar un 60% de conversión a FFAE para el caso de la catálisis ácida.



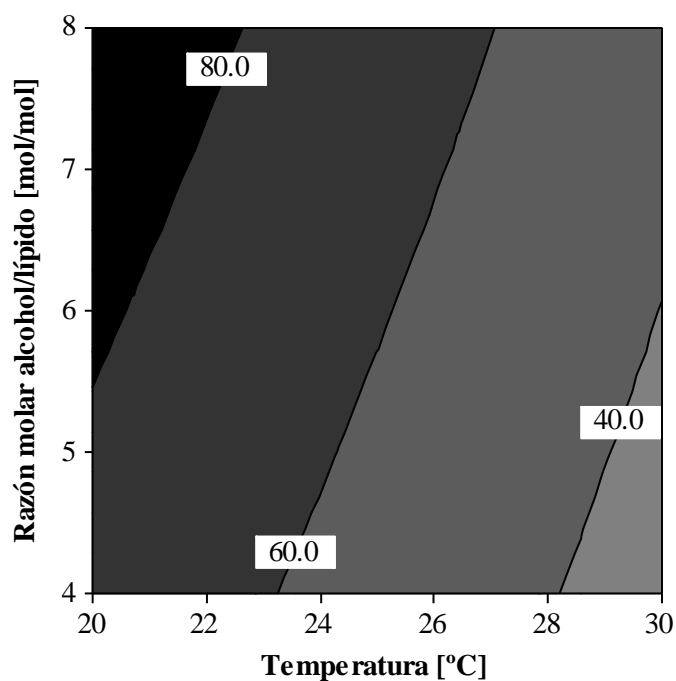
**Figura 8.** Rendimiento de FAME a 20°C, para diferentes razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol]. A) Aceite de *B. braunii*, metanol como aceptor acilo; B) Aceite de *B. braunii*, etanol como aceptor acilo; C) Aceite de *N. gaditana*, metanol como aceptor acilo; D) Aceite de *N. gaditana*, etanol como aceptor acilo.



**Figura 9.** Gráfica de efectos principales para el rendimiento de FAME con diferentes razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol], utilizando dos niveles de temperaturas, y etanol como aceptor acilo. A) Aceite de *B. braunii*; B) Aceite de *N. gaditana*

Para todos los casos estudiados, las mayores eficiencias se obtuvieron con aceite proveniente de *N. gaditana* (Figura 8), esto se puede asociar a que el contenido de ácidos grasos (fracción metilable total de lípidos) fue mayor para el caso de *N. gaditana* comparado con el aceite de *B. braunii* (Tabla 3). Por otro lado, el aceite de *B. braunii* es altamente complejo, además de triglicéridos o triacilgliceroles, contiene ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, y glucolípidos, los cuales pueden interferir en la actividad enzimática por parte de *Rhizopus oryzae*.

En definitiva, la mejor temperatura y concentración de alcohol para la producción de FAAE en este tipo de sistema, se encontró a 20°C, en una relación molar de alcohol/lípido 8:1 [mol/mol] (Figura 10).



**Figura 10.** Gráfica de contorno para el rendimiento de FAAE, con dos razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol], utilizando dos niveles de temperaturas, etanol como aceptor acilo, y aceite de *N. gaditana* como materia prima.

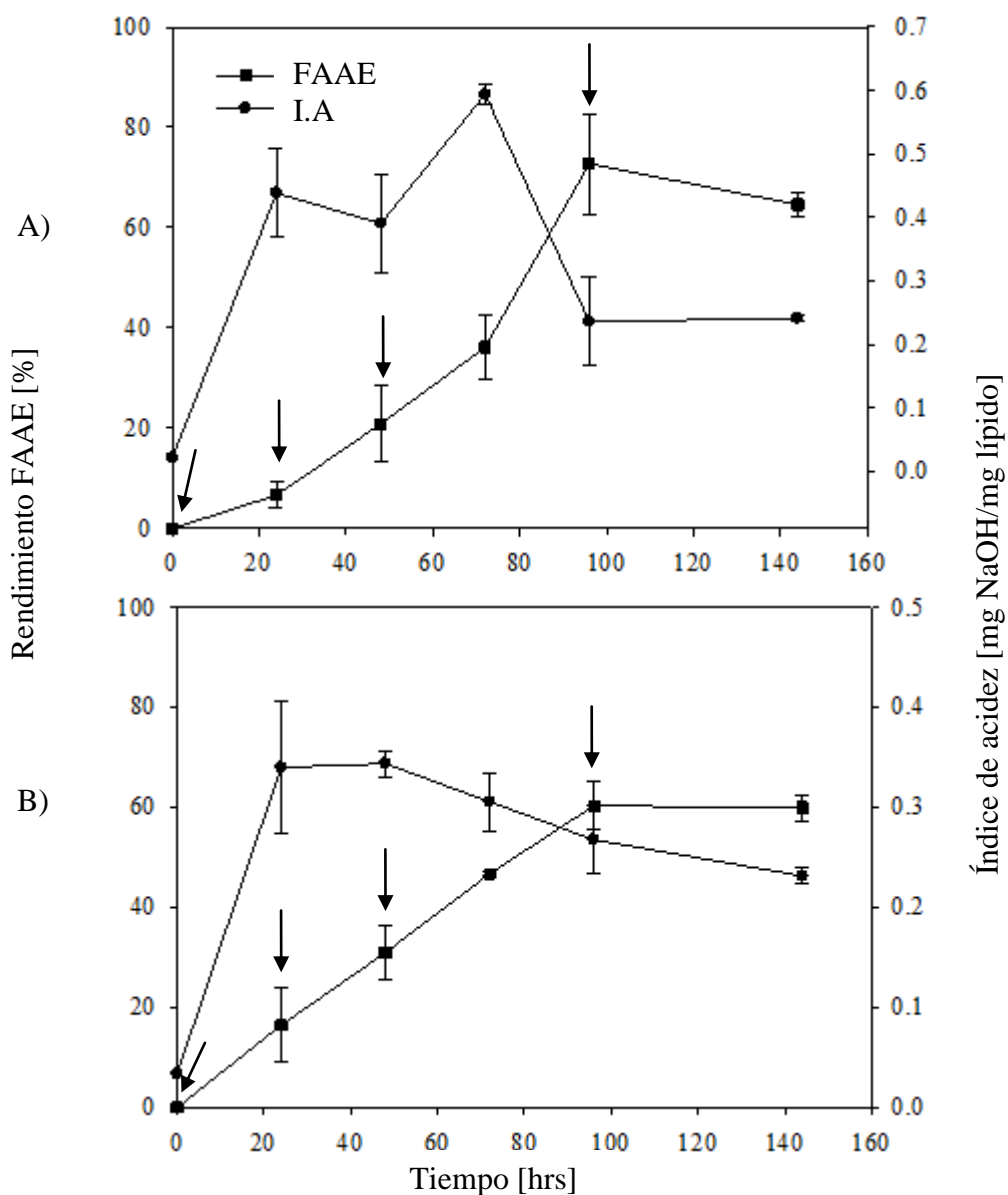
La gráfica de contorno (Figura 10) para el rendimiento de FAAE, utilizando etanol como aceptor acilo, y aceite de *N. gaditana* como materia prima, evidenció mejores resultados a 20°C en una proporción de alcohol/aceite de 8:1 [mol/mol]. Con estas condiciones, se alcanzó un promedio máximo de 91,9% en conversión a FAAE. Estos resultados demuestran la factibilidad de obtener FAAE a partir de aceite de microalgas utilizando *R. oryzae* como catalizador *whole-cell*, y además sugieren la posibilidad de establecer una operación a baja temperatura, con la consiguiente disminución del costo energético necesario del proceso.

Por último, al observar las gráficas 7 y 8, queda en evidencia que el incremento de la temperatura tuvo un efecto más significativo sobre la productividad de FAAE, que el incremento en la dosis de alcohol. Esto, podría confirmar que el brusco incremento en la temperatura y su consecuente efecto en el aumento de la saturación en la fase gaseosa, provoca una mayor condensación del alcohol, que inevitablemente entra en contacto con el microorganismo en forma líquida, situación que se agudizó con cada aumento en la temperatura. La inhibición generada en estos escenarios (30 y 40°C), tuvo un drástico desenlace en el porcentaje de FAAE obtenido, lógicamente con respecto a los tratamientos sometidos a una baja temperatura (20°C).

En relación a estos resultados, *R. oryzae* ha mostrado ser un catalizador robusto, capaz de resistir y mantenerse activo en un ambiente desfavorable compuesto de aceites complejos y alcohol, logrando eficiencias sobre el 90% de FAAE a 20°C. Lo anterior también se explica en parte por la alta hidrofobicidad de la pared celular en esta especie (cuya composición incluye compuestos insolubles como quitosano y quitina) y a la ventajosa disposición del sistema propuesto, que permite dosificar lentamente el alcohol a bajas temperaturas, en forma gaseosa, lo cual evita el contacto directo del microorganismo con el alcohol.



**5.1.2 Cinética de la reacción.** Para determinar el tiempo de operación del sistema y los fenómenos que están ocurriendo en el reactor trifásico, se realizaron cinéticas para la producción de FAAE e índice de acidez (I.A), usando las mejores condiciones operacionales determinadas a partir de los experimentos previos. Los resultados se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Cinética de producción de FAAE y ácidos grasos libres, usando etanol como aceptor acilo y dos aceites de microalga. A) Aceite de *N. gaditana* y B) Aceite de *B. braunii*. Las flechas indican las recargas de alcohol al sistema.

En este experimento, la hidrólisis de los diferentes aceites se determinó por la medición del Índice de Acidez (I.A). La ocurrencia de esterificación fue evaluada en términos del comportamiento de la concentración de ácidos grasos libres (FFA), considerando que una disminución del contenido de FFA indica su esterificación a FAME.

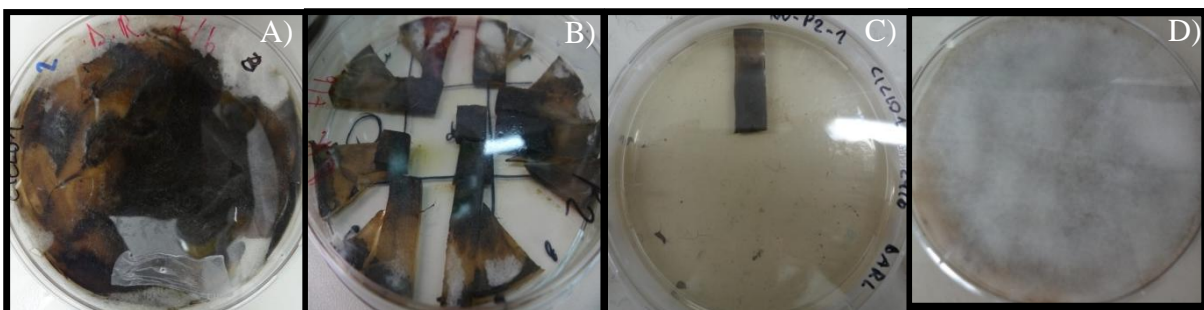
La Figura 11A, muestra el resultado para el aceite de *N. gaditana*, y la Figura 11B muestra el resultado para el aceite de *B. braunii*. En ambos casos, se observó que a medida que se incorporó alcohol al sistema en varias etapas, se incrementó el contenido de FFAE. De igual modo, se refleja un aumento en el contenido de ácidos grasos libres, los cuales disminuyen cuando se estanca la producción de FFAE, lo cual indica que estos son consumidos para su posterior esterificación a FFAE. Este resultado confirma que las lipasas de *R. oryzae*, hidrolizan el aceite a ácidos grasos libres, para posteriormente esterificarlos a FFAE. En ambos ensayos, se observa que la producción de FFAE concluye a las 96 horas de reacción. Las velocidades de producción de FFAE para aceite de *N. gaditana* y *B. braunii* son de 0.9 FFAE/h y 0.6 FFAE/h, respectivamente.

El tiempo de reacción en este sistema fue significativamente alto en comparación con los resultados mostrados por Royon *et al.* (2007), en cuya investigación logró un 80% de rendimiento de FAME luego de 5 horas de reacción, utilizando Novozym 435 como catalizador, *ter*-butanol como co-solvente y razón molar metanol/aceite 6/1; o al ser contrastado con los estudios realizados por Al-Zuhair *et al.* (2009), que en 10 horas de reacción alcanzaron un 35 % de FAME en un medio sin solvente utilizando lipasa de *Pseudomonas cepacia* como catalizador, y también obtuvo un 5,9 % de FAME en 62 horas de reacción utilizando lipasa de *Candida antarctica* y *n*-hexano como co-solvente. Sin embargo, hay que considerar que en el presente estudio se utilizó un sistema estático, y un transporte difusivo de los compuestos requeridos para el proceso de esterificación; esto implica, que de acuerdo a las condiciones operacionales determinadas en este estudio, la investigaciones futuras en esta línea deben ser enfocadas a mejorar el aumento de la transferencia de masa y consecuente optimización de los rendimientos de FFAE en menores tiempos de reacción.

### 5.3 Reutilización del catalizador *whole-cell*

Se investigó la factibilidad de reutilizar *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* luego de ser sometido a un ciclo de producción de biodiesel. Para esto, se utilizaron las mejores condiciones para el rendimiento de FAAE determinado a partir de los resultados descritos anteriormente; es decir, a 20°C, utilizando etanol como aceptor acilo, aceite de *N. gaditana* como materia prima, en una razón molar alcohol/lípido de 8/1 [mol/mol], y cumplidas 96 horas de reacción. Una vez finalizado el primer ciclo, se iniciaron dos formas de reutilización: a) Re-inoculación del microorganismo al final del ciclo de producción de biodiesel, en una nueva placa con medio de cultivo; b) Reutilización del catalizador *whole-cell* al final del ciclo de producción de biodiesel, incorporando nuevo sustrato en el mismo sistema.

Para el caso de la re-inoculación (Figura 12), de los 9 inóculos muestreados desde la placa que finalizó el ciclo 1 (en duplicado), ninguno evidenció algún indicio de re-colonización en la nueva placa para comenzar otro ciclo. Mientras que, el experimento control de estos ensayos, cuyo inóculo fue extraído desde una placa stock, colonizó completamente la placa receptora al completarse los 7 días de observación de este ensayo.



**Figura 12.** Ensayo de reutilización del microorganismo luego de un ciclo de producción de biodiesel. A) Placa al finalizar un ciclo de producción de biodiesel; B) Muestreo desde distintas zonas de la placa. C) Crecimiento observado luego de 7 días; D) Control.

Con respecto a la reutilización incorporando nuevo sustrato en el mismo sistema, los resultados indicaron que la recarga de aceite sobre el catalizador *whole-cell* que permanecía en la placa, no

fue utilizada por el microorganismo como fuente de carbono para su crecimiento, ya que tampoco se registró algún cambio visible que reflejara la re-colonización del microorganismo en la placa Petri.

Estos resultados indican que, la incorporación de este tipo de materia prima en dos etapas (la primera para promover la colonización del *R. oryzae* en el sistema, y la segunda para esterificar) puede estar influyendo negativamente en la normal respiración celular de un microorganismo aerobio como éste, limitando la posibilidad de re-colonizar el sistema. De acuerdo a lo anterior, se sugiere en una siguiente investigación, estudiar el efecto de la adición del aceite en una sola etapa, o en una modalidad alternativa, en la cual el micelio no sea totalmente cubierto por el aceite de microalgas, sino en cuya aplicación se asegure un buen formato que beneficie el efectivo acceso del microorganismo al sustrato en términos de biodisponibilidad. Esto, procurando no generar anaerobiosis, que en este caso dejó imposibilitada la oportunidad de continuar la actividad metabólica del microorganismo, y su importante nexo con el sustrato para la síntesis del catalizador.

La relevancia de esto, guarda relación con los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de esta reacción, en donde se mencionó que *R. oryzae* primero hidroliza los triglicéridos con el fin de acceder a los carbonos necesarios para su consumo, y en consecuencia, los ácidos grasos libres son esterificados a FAAE. En definitiva, el efecto del catalizador para la producción de biodiesel, tiene un inherente vínculo con el hecho de proveer aquellas condiciones que propicien el contacto del microorganismo con el sustrato, su crecimiento y colonización en el sistema, y su permanencia metabólicamente activa en el tiempo.

## 6. CONCLUSIONES

La innovación de utilizar una materia prima alternativa de naturaleza compleja como el aceite de las microalgas *Nannochloropsis gaditana* y *Botryococcus braunii*, cuya composición incluye polímeros y ceras, entre otros, junto a la aplicación de *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* en un biorreactor trifásico, hizo factible la conversión de ácidos grasos a biodiesel al proporcionar condiciones adecuadas para mantener el hongo activo y simultáneamente favorecer la producción de biodiesel.

Las condiciones óptimas, que permitieron obtener hasta un 91% de conversión a FFAE aplicando *Rhizopus oryzae* como catalizador *whole-cell* en un biorreactor multifase, fueron a 20°C, utilizando etanol como aceptor acilo en una razón molar alcohol/lípido de 8/1 [mol/mol] y 96 horas de reacción.

Debido al mayor contenido de ácidos grasos del aceite de *N. gaditana*, se presentaron mayores conversiones de FFAE que con el aceite de *B. braunii*, indicando probablemente que es un aceite más disponible para el microorganismo. Sin embargo, el alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados del aceite de *N. gaditana* indica que el producto poseerá una alta inestabilidad en el tiempo.

Los tratamientos de re-inoculación y re-utilización estudiados luego de un ciclo de producción de biodiesel, fueron prácticas en donde el formato de incorporación del aceite no permitió reutilizar el microorganismo directamente debido probablemente a su inhibición por anaerobiosis.

## 7. PROYECCIONES

Se propone generar una estrategia para mantener el hongo vivo y activo durante todo el proceso, para su utilización en una nueva reacción como microorganismo productor de lipasas.

El uso de un hongo primitivo como *Rhizopus oryzae* tiene proyecciones interesantes en procesos biotecnológicos para la producción de biodiesel, ya que presentó cierta tolerancia a bajas dosis de solventes orgánicos, facilitando su directo empleo en un ambiente con liberación paulatina de alcohol en fase gaseosa, con lo cual resulta innecesario recurrir a procesos de aislamiento, purificación, e inmovilización enzimática.

Esto, junto a la particular diversidad enzimática descomponedora en organismos saprófitos, hacen de este microorganismo productor de lipasas, un catalizador *whole-cell* robusto y versátil para este tipo de reacción, con aceite de microalgas como materia prima.

## 8. LITERATURA CITADA

**Akoh, C.C., Lee G.C., Liaw Y.C., Huang TH, Shaw JF.** 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43:534-552

**Antczak, M. S., Kubiak, A., Antczak, T. Bielecki, S.** 2009. Enzymatic biodiesel synthesis. Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*. 34:1185-1194.

**Al-Zuhair S, Wei F, Jun L.** 2007. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*. 42:951-960.

**Al-Zuhair, S., Dowaidar, A., Kamal, H.** 2009. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 44:256-262.

**APHA,** 1998. Standard methods for the examination of waste and wastewater. American public health association. Washington, DC.

**Araújo, J.** 1995. Oxidação de Lipídios. Imprensa Universitária (ed.), Química de alimentos: Teoría e prática. Universidad Federal de Viçosa:Viçosa. 1- 64

**Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H. J., Muñoz, R., Navia, R.** 2010. Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 109:609-614.

**Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H. J., Navia, R.** 2010. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88:621-636.

**Ban, K., Hama, S., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Noda, H. Fukuda, H.** 2002. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 17:157-165.

**Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Fukuda, H.** 2001. Whole-cell biocatalyst for biodiesel production utilizing *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 8:39-43.

**Barnwal, B.K. y Sharma, M.P.,** 2005. Prospects of biodiesel production from vegetables oils in India. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 9:363-378.

**Ben Salah, A, Fendri K, Gargouri Y.** 1994. La lipase de *Rhizopus oryzae*: production, purification et caractéristiques biochimiques. *Revue Francaise des Corps Gras*. 5/6:133-137.

**Ben Salah, R., Ghamghui, H., Miled, N., Mejdoub, H., Gargouri, Y.** 2007. Production of butyl acetate ester by lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 4:368-372.

**Benjamin, S., Pandey, A.** 1998. *Candida rugosa* lipase: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*. 14:1069-1087.

**Beznec, A., Curutchet, G.** 2008. *Cultivo y producción de hidrocarburos por Botryococcus braunii en aguas contaminadas. Potencial de biorremediación.* Trabajo presentado en el V Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental. Mar del Plata, Argentina.

**Carrillo, M.L., Zavala, D., Alvarado, B.** 2007. Modelado del Efecto de la Temperatura, Actividad de Agua y pH sobre el Crecimiento de *Rhizopus oryzae*. *Información tecnológica*. 18(4):57-62.

**Carta, F.S., Soccol, C.R., Ramos, L.P., Fontana, J.D.** 1999. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 68:23-28.

**Chen, J.P., Chang, S. C.** 2008. Production of biodiesel by immobilized whole-cell biocatalyst *Journal of Biotechnology*.10:88.

**Chisti, Y.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294-306.

**Ciudad, C., Reyes, I., Azócar, L., Briones, R., Jorquera, M., Wick, Y. L., Navia, R.** 2011. Innovative approaches for effective selection of lipase-producing microorganisms as whole cell catalysts for biodiesel production. *New Biotechnology*. 28(4):375-381.

**Ciudad, G., Reyes, I., Jorquera, M., Azocar, L., Wick, L. Y. Navia, R.** 2011. Novel three-phase bioreactor concept for fatty acid alkyl ester production using *R. oryzae* as whole cell catalyst. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(11):2505-2512.

**Devanesan, M. G., Viruthagiri, T., Sugumar, N.** 2007. Transesterification of Jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens* *African Journal of Biotechnology*.6:2497-2501.

**Du, W., Xu, Y.Y., Liu, D.H., Zeng, J.** 2004. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 30:125-129.

**Encinar, J.M., Gonzalez, J.F., Rodriguez-Reinares, A.** 2007. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. *Fuel Processing Technology*. 88:513-522.

**Fukuda, H.** 2003. Production of biodiesel fuel as clean energy. *Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*. 77:23-25.



**Ghamgui, H., Karra-Chaäbouni, M., Gargouri, Y.,** 2004. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: A comparative study between n-hexane and solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*. 35:335-363.

**Hama, S., Tamalampudi, S., Fukumizu, T., Miura, K., Yamaji, H., Kondo, A., Fukuda, H.** 2006. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101:328-333.

**Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H. Fukuda, H.** 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles *Biochemical Engineering Journal*. 34:273-278.

**Heipieper, H. J., Neumann, G., Cornelissen, S. Meinhardt, F.** 2007. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Applied Microbiology Biotechnology*. 74:961-973.

**Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, L.C.** 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26:421-430.

**Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. Shrestha, S.** 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 16:53-58.

**Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H.** 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91:12-15.

**Kargbo, D.M.** 2010. Biodiesel Production from Municipal Sewage Sludges. *Energy Fuels*. 24:2791–2794.

**Kirk, R.E., Othmer, D.F.** 1962. Enciclopedia de tecnología química. Tomo 6, Editorial UTHEA.

**Knothe, G.** 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*. 86:1059–1070.

**Knothe, G., Gerpen, J.V., Krahl, J.** 2005. *The Biodiesel Handbook*. Champaign, Illinois. Copyright © AOCS Press.

**Koeller, K.M., Wong, C.** 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. 409:232-240.

- Lam, M.K., Lee, K.T., Mohamed, A.R.** 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*. 28:500–518.
- Leung, D., Guo, Y.** 2006. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. *Fuel Processing Technology* 87:883–890.
- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L., Li, Z.** 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rape-seed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 43:58–62.
- Li, Q., Du, W. Liu, D. H.** 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:749-756.
- Li, X.F., Xu, H., Wu, Q.Y.** 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 98:764-771.
- Macedo, G.A., Pastore, G.M., Rodriguez M.I.** 2004. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus oryzae* lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry*. 39:687-692.
- Mass, R.H., Bakker, R.R., Eggink G., Weusthuis, R.A.** 2006. Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:861-868.
- Méndez, J., Oromi, M., Cevero, M., Balcels, M., Torres, M., Canela, R.** 2007. Combining Regio- and Enantioselectivity of lipases for the preparation of (R)-4-Chloro-2-butanol. *Chirality*, 19:44-50.
- Miao, X.L., Wu, Q.Y.** 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97:841-846.
- Moser, B.R.** 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 45(3):229–266.
- Nakashima, K., Arai, S., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A. Fukuda, H.** 2009. Production of biodiesel fuel in ionic liquids catalyzed by whole-cell biocatalysts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.108:43-43.
- Nakashima, K., Arai, S., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A., Fukuda, H.** 2010. Production of biodiesel fuel in ionic liquids catalyzed by whole-cell biocatalysts *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 46:51-55.

- Neumann, G., Kabelitz, N., Zehnsdorf, A., Miltner, A., Lippold, H., Meyer, D., Schmid, A., Heipieper, H. J.** 2005. Prediction of the Adaptability of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a Second Phase of a Solvent for Economically Sound Two-Phase Biotransformations. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:6606–6612.
- Nikolova, P., Ward, O.P.** 1993. Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 12:76–86.
- Nunes, P.A, Pires Cabral,P., Guillén, M., Valero, F., Luna, D., Ferreira-Dias, S.** 2011. Production of MLM-Type structured lipids catalyzed by immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 88:473-480.
- Oliveira, P., Jares, F., Ikegaki, M.** 2006. Enzymatic resolution of (R, S)-ibuprofen an (R, S)-ketopren by microbial lipases from native and commercial sources. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37:329-337.
- Palomo, J.M, Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R.** 2004. Enzymatic resolution of (±)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques. *Tetrahedron: Asymmetry*. 15:1157-1161.
- Pessoa, F., Magalhães, S. Falcão, P.** 2010. Production of biodiesel via enzymatic ethanolysis of the sunflower and soybean oils: modeling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161:238–244.
- Phan, A.N., Phan, T.M.** 2008. Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel* 87:3490-3496.
- Posten, C. Schaub, G.** 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels: A process view. *Journal of Biotechnology*. 142:64-69.
- Prasanna, L. Pydi, Y.** 2008. Liquid–solid mass transfer in a two phase fluidized bed bioreactor *Chemical Engineering Journal*. 135:135–140.
- Qin, H. E., Yan, X. U., Teng, Y., Wang, D.** 2008. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal Catalysis*. 29:41-56.
- Rehmann, L. Daugulis, A.** 2007. Biodegradation of biphenyl in a solid–liquid two-phase partitioning bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 36:195–201.
- Rivera, C., García, F.** 2007. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.P. 128, La Paz, Baja California Sur, México.

**Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. Locatelli, S.** 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*. 98:648–653.

**Saito, K., Kawamura, Y., Oda, Y.** 2003. Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30:440-444.

**Samorì, C., Torri, C., Samorì, G., Fabbri, D., Galletti, P., Guerrini, F., Pistocchi, R. Tagliavini, E.** 2009. Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource Technology*. 12:68.

**Sánchez, E.** 2012. Perspectivas del proceso de producción de biodiesel de tercera generación. *Ingeniator*, ISSN: 2027-9396.

**Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B.** 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Resources*. 1:20-43.

**Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y.** 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase *Journal of the American Oil Chemists Society*. 76:789-793.

**Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y.** 2002 Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 17:133-142.

**Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. Merzlyak, M.N.** 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. *Journal of Applied Phycology*. 20:245-251.

**Takahashi, T., Tsuchida, Y., Irie, M.** 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *Journal of Biochemistry*. 84(5):1183-1194.

**Talukder, M., Beatrice, K., Puay Song, O., Puah, S., Wu, J., Won, C.** 2008. Improved method for efficient production of biodiesel from palm oil. *Energy Fuels*. 22:141–4.

**Thomas, W.H., Tornabene, T.G., Weissman, J.** 1984. Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. 231-2207.

**Thongchul, N., Navankasattusas, S., Yang, S.** 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 33:407-416.

- Torres, D., Melgarejo, R., Gutiérrez, M., Aguilera, L., M. Micheletti, M., Lye, G. Huerta, S.** 2009. Hydrodynamic and oxygen mass transfer studies in a three-phase (air–water–ionic liquid) stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 45:209–217.
- Umdu, E. S., Tuncer, M. Seker, E.** 2009. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. *Bioresource Technology*. 100:2828–2831.
- Van Sonsbeek, H., Beeftink, H. Tramper, J.** 1993. Two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*. 15:722–729.
- Vicente, G., Bautista, L. F., Rodriguez, R., Gutierrez, F. J., Sadaba, I., Ruiz-Vazquez, R. M., Torres-Martinez, S. Garre, V.** 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*. 48:22-27.
- Xiao, M., Intan, R., and P., O.J.** 2010. *Biodiesel production from microalgae oil-lipid feedstock via immobilized whole-cell biocatalysis*. Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste. Venice, Italy.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q.** 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78:29-36.
- Xu, H., Miao, X. L. Wu, Q. Y.** 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126:499-507.
- Xu, Y.Y., Du, W., Liu, D. H. Zeng, J.** 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology Letters*. 25:1239-1241.
- Yu, R.C., Hang Y.D.** 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*. 11:597-600.
- Zhu, J., Zheng, Y., Karamanev, D. Bassi, A.** 2000. (Gas-) Liquid-Solid Circulating Fluidized Beds and their Potential Applications to Bioreactor Engineering. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 78:82-94.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla resumen de los porcentajes en promedio de conversión a FAAE, a distintas temperaturas (°C), con metanol (MeOH) y etanol (EtOH) como aceptores acilo, utilizando aceite de las microalgas *Nannochloropsis gaditana* (Ng) y *Botryococcus braunii* (Bb), en una razón molar Alcohol/Lípido (A/L) de 4:1[mol/mol].

Temperatura (°C)	Alcohol	Aceite	Alcohol/Lípido [mol/mol].	FAAE (%) Prom.	Desv. Est.	
T°20	MeOH	Ng	METxNG(4:1)	38,8	±	20,8
		Bb	METxBB(4:1)	35,8	±	5,9
	EtOH	Ng	ETxNG(4:1)	73,1	±	11
		Bb	ETxBB(4:1)	38,2	±	3,7
T°30	MeOH	Ng	METxNG(4:1)	13,1	±	5,7
		Bb	METxBB(4:1)	21,9	±	2,8
	EtOH	Ng	ETxNG(4:1)	32,8	±	4,4
		Bb	ETxBB(4:1)	32,4	±	4,1
T°40	MeOH	Ng	METxNG(4:1)	11,5	±	6,7
		Bb	METxBB(4:1)	3,3	±	1,4
	EtOH	Ng	ETxNG(4:1)	16	±	14,2
		Bb	ETxBB(4:1)	1	±	1,7

**Anexo 2.** Tabla resumen de los porcentajes en promedio de conversión a FAAE a 20°C, con metanol (MeOH) y etanol (EtOH) como aceptores acilo, utilizando aceite de las microalgas *Nannochloropsis gaditana* (Ng) y *Botryococcus braunii* (Bb), a diferentes razones molares de Alcohol/Lípido (A/L) [mol/mol].

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Alcohol</b>	<b>Aceite</b>	<b>Alcohol/Lípido [mol/mol].</b>	<b>FAAE (%) Prom.</b>	<b>Desv. Est.</b>	
T°20	MeOH	Ng	METxNG(4:1)	26,8	±	2
			METxNG(8:1)	79,8	±	13,7
			METxNG(12:1)	44,6	±	6,3
		Bb	METxBB(4:1)	35,8	±	5,9
			METxBB(8:1)	42,4	±	5,1
			METxBB(12:1)	23,3	±	0,4
	EtOH	Ng	ETxNG(4:1)	73,1	±	11
			ETxNG(8:1)	91,9	±	9,5
			ETxNG(12:1)	55,6	±	3
		Bb	ETxBB(4:1)	38,2	±	3,7
			ETxBB(8:1)	57	±	5
			ETxBB(12:1)	33,3	±	8,2

**Anexo 3.** Datos correspondientes a la cinética de la reacción, de acuerdo al promedio de los porcentajes de la producción de FAAE, y al Índice de Acidez obtenido mediante la titulación con NaOH 0,02 M. Tratamiento a 20°C, con etanol como aceptor acilo, utilizando aceite de la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Ng), y una razón molar Alcohol/Lípido 8:1 [mol/mol].

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>FAAE (%) Prom.</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Valor Ácido (mg NaOH/mg lípidos)</b>	<b>Desv. Est.</b>
0	0,00	± 0,00	0,02	± 0,00
24	8,32	± 4,73	0,44	± 0,07
48	20,30	± 12,17	0,39	± 0,08
72	38,66	± 10,87	0,59	± 0,02
96	72,46	± 19,88	0,24	± 0,07
144	65,60	± 4,74	0,24	± 0,01
Control	0,00	± 0,00	0,20	± 0,03

**Anexo 4.** Datos correspondientes a la cinética de la reacción, de acuerdo al promedio de los porcentajes de la producción de FAAE, y al Índice de Acidez obtenido mediante la titulación con NaOH 0,02 M. Tratamiento a 20°C, con etanol como aceptor acilo, utilizando aceite de la microalga *Botryococcus braunii*, y una razón molar Alcohol/Lípido 8:1 [mol/mol].

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>FAAE (%) Prom.</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Valor Ácido (mg NaOH/mg lípidos)</b>	<b>Desv. Est.</b>
0	0,00	± 0,00	0,03	± 0,00
24	16,89	± 7,42	0,34	± 0,07
48	30,33	± 5,02	0,34	± 0,01
72	46,05	± 0,06	0,31	± 0,03
96	60,26	± 8,91	0,27	± 0,03
144	60,17	± 3,51	0,23	± 0,01
Control	0,90	± 0,30	0,54	± 0,05