

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE ACEITE DE TRES CEPAS DE MICROALGAS
COMO FUENTE DE LÍPIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

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.

ÁLVARO DEMECIO SUAZO CONEJERO

TEMUCO – CHILE

2014

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE ACEITE DE TRES CEPAS DE MICROALGAS
COMO FUENTE DE LÍPIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

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.

ÁLVARO DEMECIO SUAZO CONEJERO

TEMUCO – CHILE

2014

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE ACEITE DE TRES CEPAS DE MICROALGAS
COMO FUENTE DE LÍPIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

PROFESOR GUIA : _____

RODRIGO JAVIER NAVIA DIEZ
INGENIERO QUÍMICO
MASTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA MINERÍA
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESORES CONSEJEROS : _____

SIMONET EVELYN TORRES GALVEZ
QUÍMICO
DOCTOR EN QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE ACEITE DE TRES CEPAS DE MICROALGAS
COMO FUENTE DE LÍPIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

PROFESOR GUIA : _____

RODRIGO JAVIER NAVIA DIEZ
INGENIERO QUÍMICO
MASTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA MINERÍA
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESORES CONSEJEROS : _____

SIMONET EVELYN TORRES GALVEZ
QUÍMICO
DOCTOR EN QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

AGRADECIMIENTOS

- Proyecto FONDECYT N° 11121591. “Byopolymers obtained from microalgae biomass: physiochemical characterization and application in biocomposites”. Investigador principal: Dr. Simonet Torres. La presente tesis de pregrado fue financiada con fondos de dicho proyecto.
- Laboratorio N°5, Scientific and Technological Bioresource Nucleus, BIOREN-UFRO.
- Consorcio Tecnológico Desert Bioenergy S.A.
- Universidad de Antofagasta. Chile.

ÍNDICE

<i>Capítulo</i>		<i>Página</i>
1	INTRODUCCION	10
2	ANTECEDENTES GENERALES	12
2.1	Microalgas	12
2.2	Genética de diferentes cepas de microalga	16
2.3.1	Composición química de microalgas	19
2.3.2	Comparación de la composición de diferentes cepas	20
2.4.1	Composición química de aceites y biodiesel	22
2.4.2	Composición química del aceite de microalga	28
2.5.2	Características de biodiesel de microalga	30
3	OBJETIVOS	32
3.1-3.2	Objetivo general y específicos	32
3.3	Hipótesis	32
4	MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1	Materiales	33
4.1.1	Equipos	33
4.2	METODOLOGÍA	34
4.2.1	Caracterización de biomasa inicial	34
4.2.1.1	Determinación del contenido de sólidos totales y volátiles en muestras de biomasa microalgal.	34
4.2.1.2	Metodologías análisis proximales de biomazas microalgales iniciales.	35
4.2.2	Caracterización de fracción lipídica.	35
4.2.2.1	Extracción de lípidos en solución por metodología de Bligh and Dyer	35
4.2.2.2	Extracción secuencial de acuerdo a Bertheas et al. (1999)	36
4.2.2.3	Extracción de lípidos por método Soxhlet previa hidrólisis ácida.	36
4.2.2.4	Obtención de ácidos grasos por metilación de aceites (Araujo 1995).	37

ÍNDICE

<i>Capítulo</i>		<i>Página</i>
4.2.2.5	Análisis metil ésteres por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS):	38
4.2.2.7	Determinación de carotenoides y clorofilas por HPLC.	38
4.2.3	Obtención de biodiesel a partir de 3 cepas de microalgas.	39
4.2.3.1	Transesterificación directa de biomasa microalgal	39
4.2.3.2	Neutralización del biodiesel obtenido a partir de microalgas.	41
4.2.3.3	Refinación de biodiesel obtenido a partir de microalgas	42
5	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
5.1	Caracterización de biomasa inicial	43
5.1.2	Determinación de análisis proximales de biomazas microalgales iniciales.	43
5.2	Extracción de lípidos en solución por metodología de Bligh and Dyer (B&D).	45
5.3	Extracciones secuenciales protocolo Bertheas et al. (1999)	47
5.4	Extracción de lípidos por método Soxhlet previa hidrólisis ácida.	48
5.5	Medición de ácidos grasos por metilación de aceites e inyección en GC.	49
5.6	Perfil de ácidos grasos metilados de lípidos totales.	49
5.7	Determinación de carotenoides y clorofilas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).	54
5.8	Obtención de biodiesel a partir de tres cepas de microalgas.	56
5.9	Refinación de biodiesel obtenido a partir de microalga.	58
6	CONCLUSIONES	59
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8	ANEXOS	63

RESUMEN

Las microalgas, se han presentado como una potencial alternativa a la utilización de combustibles derivados del petróleo. La característica principal que las sitúa como opción para la generación de biocombustible es su capacidad de convertir energía solar en biomasa, metabolismo que les permite almacenar cantidades considerables de lípidos dentro de su estructura, particularmente en forma de triglicéridos, también llamados triacilgliceroles, triacilglicéridos o abreviados TAG.

Al ser un organismo vivo su capacidad productora de lípidos está sujeta a diversos factores tanto genotípicos como fenotípicos, así como medioambientales. La amplia gama y variedad de especies es tal que han sido material de estudio desde hace varios años, donde se intenta identificar aquellas que cumplan características deseadas. En el presente estudio se trabajó con tres cepas de microalgas con la finalidad de caracterizarlas en cuanto a capacidad productora de lípidos totales, y su perfil lipídico post reacción de metilación para la obtención de ácidos grasos. Por otro lado, la biomasa de cada especie fue sometida a una reacción de transesterificación directa con catalizador ácido para la generación de biodiesel. El biocombustible obtenido fue analizado a través de cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) donde al igual que los aceites de cada especie, fue analizada la fracción lipídica transesterificable.

Al igual que el diesel convencional, el biodiesel cualquiera sea su naturaleza, debe ser estudiado para determinar si se acomoda a las normativas regidas por el país. Habiendo obtenido los productos de cada cepa en estudio tanto aceites como biodiesel, estos fueron sometidos al análisis de contenido de carotenoides y clorofilas los cuales pueden perjudicar el uso en motores. La generación de biodiesel a partir de microalgas a través de la reacción de transesterificación ácida, genera un producto con remanentes del catalizador lo que hizo necesaria la neutralización del mismo.

SUMMARY

Microalgae have been presented as a potential source that provides an alternative to the use of petroleum derived fuels. The main feature that stands as an option for the generation of biofuel is its ability to convert solar energy into biomass. In turn, the metabolism of microalgae allows to store considerable amounts of lipids in their composition, particularly in the form of triglyceride, also called triacylglycerol, triacylglycerol or TAG abbreviated .

As a living organism their lipid production capacity is subject to various factors both genotypic and phenotypic, as well as environmental. Due to the wide range and variety of species, microalgae have been studied for several years trying to identify those with the desired characteristics. In the present study we used three strains of microalgae to characterize them in terms of production capacity of total lipids, properties of each oil contained in these strains and their lipid post methylation reaction for obtaining TAG. Furthermore, the biomass of each species was subjected to a direct transesterification with acid catalyst to generate biodiesel. This biofuel obtained was analyzed by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) where the transesterifiable lipidic fraction was evaluated in the same way that the oils of each species.

Similar to diesel, biodiesel independent of its origin, should be studied to determine if it complies with the normative of each country. After obtaining the products of each strain studied (oils and biodiesel) these were subjected to analysis of carotenoids and chlorophylls because it is assumed that they correspond to a contaminant and/or no required compounds. Moreover, the generation of biodiesel from algae through the acidic transesterification reaction results in a product with residual catalyst, so neutralization was required.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las tecnologías en materia energética dedican especial énfasis en la búsqueda de materias primas renovables que posean las propiedades para producir combustibles económicos, amigables con el medio ambiente y que disminuyan el uso del diesel convencional. Sin embargo y a pesar de que muchas de estas materias primas poseen las propiedades adecuadas, el balance energético que implica producir dichos biocombustibles hace que el costo sea uno de sus principales problemas. Las materias primas convencionales que se emplean para producir biodiesel derivan en un gran porcentaje en aceites vegetales.

Es así, que tanto el biodiesel obtenido a partir de aceites comestibles y no comestibles, se denominan biodiesel de primera y segunda generación respectivamente. Como ya se mencionaba, los costos asociados a la producción de biodiesel a partir de aceites de uso industrial son su principal desventaja; esto sumado a la competencia directa con la ocupación de terrenos de cultivo para uso agroalimentario ya sea humano como animal significan otro considerable punto en contra. Por ello nuevas fuentes de aceites más baratas y más amigables con el medioambiente surgen dentro de una nueva categoría, denominada biodiesel de tercera generación; esta última incluye tanto aceites residuales de frituras, como aceites provenientes de lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas y por supuesto biodiesel producido a partir de las microalgas.

Las potenciales aplicaciones de las microalgas hoy en día son muy variadas, tanto que su estudio se ha visto potenciado en los últimos años buscando aprovechar todas sus ventajas y sus componentes para así obtener diversos productos. Se dice que son “fábricas de células” que en combinación con la luz solar y la conversión del dióxido de carbono son potenciales productores de biocombustibles, alimentos, piensos y bioactivos de alto valor. Dentro de dichos productos se ve fuertemente prometedora la obtención de biodiesel, ya que su capacidad de generar lípidos de almacenamiento principalmente en forma de triglicéridos (en adelante TAG) los sitúa como una opción real para el mercado de los biocombustibles. (Metting & Pyne, 1986; Schwartz, 1990; Kay, 1991; Shimizu, 1996, 2003; Borowitzka, 1999; Ghirardi *et al.*, 2000; Akkerman *et al.*, 2002;

Banerjee *et al.*, 2002; Melis, 2002; Lorenz & Cysewski, 2003; Metzger & Largeau, 2005; Spolaore *et al.*, 2006;).

Las microalgas en general poseen una alta tasa de conversión de energía solar en biomasa y por supuesto esta biomasa cumple con ciertas características generales, como poseer cuatro grandes componentes de interés donde destacan los lípidos, proteínas, hidratos de carbono y en menor medida los nucleótidos. La amplia gama de especies de microalgas permite escoger entre aquellas que poseen mayor cantidad de lípidos en su estructura, y que además sean cultivables a nivel industrial. De esta forma, van de la mano tanto la composición bioquímica de las microalgas en estudio, como la capacidad de cultivarlas a nivel industrial en fotoreactores o reactores abiertos (Walter *et al.*, 2005). Las microalgas pueden obtenerse tanto de agua dulce como agua salada, estas últimas suponen una gran ventaja ya que pueden ser cultivadas con agua de mar y en terrenos como el desierto, aminorando considerablemente los principales problemas presentados en la producción de biodiesel a escala industrial que son los costos de producción y la competencia directa con áreas de cultivo para uso humano/animal (Singh *et al.*, 2005).

El presente trabajo de tesis se enfocó en la caracterización de tres cepas de microalgas. Se realizaron análisis bioquímicos de la biomasa, se caracterizó el aceite obtenido y se realizó el estudio de la composición química del producto obtenido luego de realizar la transesterificación directa de biomasa microalgal. Determinar valores como el porcentaje de metil ésteres de ácidos grasos contenidos en el biodiesel y la eliminación de otros componentes como ácidos grasos libres, esteroides, hidrocarburos, cetonas, y pigmentos hacen necesaria la refinación del producto obtenido, proceso que se incluye en la presente investigación.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Microalgas

La necesidad de implementar energías renovables y de disminuir el impacto ambiental de las energías ya tradicionales ha llevado a investigar nuevos recursos energéticos que puedan reemplazar los combustibles ya existentes. Tal es el caso de biocombustible obtenido a partir de microalgas, si bien estos aún no son comerciales, su perspectiva económica es prometedora. Por otro lado, bajo el concepto de biorefinería, también se pueden obtener otros productos a partir de microalgas y ser utilizadas como materia prima renovable en la fabricación de plásticos y otros productos químicos que ahora se obtienen a partir del petróleo crudo.

Se denomina microalgas a un amplio grupo de organismos fotoautótrofos que incluye tanto especies procariontas como eucariotas. Dentro de sus características más importantes se destaca su capacidad para crecer rápidamente y su eficiente conversión de energía solar en biomasa. El contenido de lípidos y ácidos grasos de microalgas varían dependiendo de las condiciones de cultivo, por lo que el contenido de lípidos se puede mejorar mediante el estrés por ausencia de nitrógeno o de otros factores de estrés (FAO, Oil production. FAO Corp Doc Repository). Su fotosíntesis permite la fijación biológica de CO₂, lo que coopera en la mitigación del aumento de CO₂ atmosférico (Amin 2009; Brennan & Owende 2010; Mutanda *et al.*, 2011). Cabe destacar que las microalgas son de 10 a 50 veces más eficientes que las plantas en términos de la fijación de CO₂ (Wang *et al.* 2008). Además, su producción puede llevarse a cabo en áreas no aptas para el cultivo como lagos, océanos o desiertos, por lo tanto se reduce la competencia con la producción de alimentos (Stephens *et al.*, 2010). El biodiesel a partir de microalgas tiene un poder calorífico alto (30 y 29 MJ/kg en *C. protothecoides* y *Microcystis aeruginosa*, respectivamente), baja viscosidad y densidad en comparación con el biocombustible obtenido a partir de plantas (Costa & de Morais, 2007). Sin embargo, el rendimiento de biodiesel a partir de microalgas es bajo en comparación con el biodiesel obtenido a partir de biomasa vegetal (Chisti 2007; Sialve *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2010; Stephens *et al.*, 2010).

Estos organismos fotosintéticamente pueden convertir CO₂, agua y minerales en biomasa, pero algunas especies también crecen heterotróficamente. Dentro de las microalgas procariotas se encuentran las cianobacterias (algas verde-azules) y dentro de las microalgas eucariotas se incluyen las nueve divisiones de algas verdes (*phytas*) *Glaucophyta*, *Chlorophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Cryptophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta* y *Dinophyta*. Hasta la fecha, cerca de 2/3 de 50.000 especies han sido identificadas y se encuentran en la colección de diversos institutos de investigación de algas (Richmond, A., 2004).

Aunque las colecciones de algas se mantienen para muchos fines (por ejemplo, para productos farmacéuticos, alimentos, energía e industrial), sólo unos pocos cientos de cepas han sido investigados en el contenido químico y muy pocas se cultivan en cantidades industriales. Hasta la fecha, aunque hay interés creciente para desarrollar la producción de biodiesel de microalgas, el costo de producción de biomasa de microalgas es actualmente mucho mayor que el de otros cultivos energéticos (Chisti, 2007). Por lo tanto, la selección de un modelo de producción de energía costo-eficiente podría desempeñar un papel muy importante en el logro de la producción de biodiesel competitivo. Esto incluye la selección de algas altamente productoras de lípidos, zonas de cultivo adecuadas, y un cultivo eficiente asociado a métodos y procedimientos óptimos de extracción de aceite.

Sus altas tasas fotosintéticas, a menudo atribuidas a su estructura unicelular, permiten que las microalgas no sólo sirvan como una plataforma efectiva de secuestro de carbono, sino también como fuente de lípidos que acumulan rápidamente en su biomasa (Patil V., 2008; Chisti Y., 2007). Se ha reportado en la bibliografía que el contenido de aceite de algunas microalgas supera el 77% del peso seco de su biomasa, cuyo cultivo es en condiciones ideales de laboratorio y estrictamente controladas, lo que si bien dista bastante de las condiciones en terreno por ejemplo en fotorreactores, sugiere un alto porcentaje de rendimiento en cuanto a generación de lípidos contenidos en la biomasa total. Incluso usando un escenario conservador, todavía se prevé que las microalgas producirán cerca de 10 veces más biodiesel por unidad de superficie de la tierra comparado con un típico cultivo de oleaginosa terrestre (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 1998; Shenk *et al.*, 2008). Como consecuencia, los cultivos de aceite pueden

proporcionar sólo pequeñas cantidades de biodiesel para la mezcla con el diesel de petróleo a un nivel de bajos porcentajes, pero son incapaces de proporcionar las grandes cantidades de biodiesel que son necesarios para desplazar finalmente todos los combustibles de petróleo necesarios para el transporte. Por ejemplo en el aceite de palma, uno de los cultivos de aceite más productivos, los rendimientos solamente se aproximan a 5.950 litros de aceite por hectárea. Un país como los Estados Unidos requiere de casi 0,53 billones de m^3 de biodiesel al año en el ritmo de consumo actual, si todo el combustible del transporte derivado del petróleo necesitase ser reemplazado por biodiesel (Chisti Y., 2007). Para producir esta cantidad de biodiesel a partir de aceite de palma, éstas tendrían que ser cultivadas en un área de 111 millones de hectáreas. Esto es casi el 61% de toda la tierra de cultivo de los Estados Unidos. A esta escala sería entonces, poco realista porque no habría suficiente tierra para la producción de alimentos, forraje y otros cultivos. Basado en estos cálculos, es obvio que los cultivos de aceite no son capaces de sustituir a los combustibles líquidos derivados del petróleo en el futuro previsible. Este escenario es, sin embargo, diferente si se utilizan microalgas como una fuente para producir biodiesel.

Una productividad anual media de biomasa de microalgas en un sistema de producción bien diseñado que esté situado en una zona tropical puede ser de $1.535 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Sánchez Mirón. *et al.*, 1999). A este nivel de productividad de la biomasa, y si se asume un contenido de aceite promedio de 30% del peso seco de la biomasa, el rendimiento de aceite por hectárea de superficie total del país es 123 m^3 para el 90% del calendario anual (alrededor del 10% del año es considerado como no productivo, ya que la planta de producción debe ser cerrada para el mantenimiento y limpieza de rutina). Esto equivale a un rendimiento de biodiesel de microalgas de $98,4 \text{ m}^3$ por hectárea. Por lo tanto, la producción de los 0,53 billones de m^3 de biodiesel los EE.UU. necesita como combustible para el transporte, requeriría que las microalgas se cultiven sobre una superficie de 5,4 millones de hectáreas, o sólo el 3% de la superficie de cultivo de EE.UU. Este es un escenario factible incluso si el aceite de la biomasa de algas contiene sólo el 15% en peso seco (Chisti Y., 2007).

No hay otras fuentes potenciales de lípidos que se acerquen a las microalgas como reales productores de biodiesel. Considerando las ventajas de alto contenido de lípidos y la no

competición con terrenos de cultivo, una de las pocas especies vegetales competidoras es la *Jatropha Curcas L.*, cuyo contenido de lípidos en la semilla ronda entre 30-50%, sin embargo su principal inconveniente es que sus cultivos son poco homogéneos. Otra ventaja importante de las microalgas es que, a diferencia de otros cultivos de aceite, crecen muy rápidamente y por lo general doblan su biomasa dentro de 24 h. De hecho, la duración de crecimiento exponencial necesario para duplicarse puede ser tan corto como 3,5 h, lo que es significativamente más rápido que el tiempo de duplicación para el resto de los cultivos vegetales.

2.2 Genética de diferentes cepas de microalga

Cuando las especies silvestres disponibles en bibliotecas oficiales y que están descritas en la literatura no son viables para la producción comercial de biodiesel, se puede recurrir a la ingeniería genética (Gressel J., 2008), con el fin de mejorar y ajustar las características de microalgas nativas, buscando mejorar la productividad y el rendimiento. Sin embargo, las preocupaciones de contaminación biológica (materializado en la legislación restrictiva en general), han impedido una utilización más amplia de organismos genéticamente modificados incluidas las microalgas. Las varias deficiencias encontradas en la actualidad incluyen muy pocas cepas de microalgas que se han sometido a modificación genética, con la notable excepción de *Chlamydomonas reinhardtii* (el genoma de esta última ha sido totalmente dilucidado, pero es una especie de agua dulce). Además las pobres explicaciones de los mecanismos la regulación de la expresión genética subyacente, y la falta de herramientas de biología molecular (por ejemplo, una transformación nuclear eficiente), sumado a baja disponibilidad de promotores y de genes seleccionables por el fabricante, incluyendo la inestable expresión de los transgenes se traduce en un terreno de investigación muy poco explorado.

Chlamydomonas reinhardtii es la especie de microalgas más investigada, ya que tiene un genoma secuenciado (Merchant *et al.*, 2007), un número cada vez mayor de conjuntos de datos de su transcriptoma (López *et al.*, 2011), y un amplio conjunto de herramientas moleculares disponibles (Liu & Benning, 2013). Se han desarrollado estrategias genéticas exitosas en diseño de partidores y se aplica por ejemplo, para caracterizar la función de los genes implicados en la producción de

TAG en esta microalga (Li *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha discutido la posibilidad de producción de biocombustible directamente de *Chlamydomonas* (James *et al.*, 2011), y los hallazgos que apuntan a mecanismos únicos implicados en el metabolismo de TAG han llegado a ser particularmente relevantes. Se han considerado las microalgas del género *Nannochloropsis heterokont* específicamente para la producción de biocombustibles debido a su alto contenido natural de TAG. En *Nannochloropsis* no hay una vía de síntesis de almidón, lo que convierte la acumulación de TAG en el producto principal de la fijación fotosintética de carbono (Vieler *et al.*, 2012). Hasta la fecha, las secuencias del genoma se encuentran disponibles para dos especies, *Nannochloropsis gaditana* (Radakovits *et al.*, 2012), y *Nannochloropsis oceanica* (Pan *et al.*, 2011; Vieler *et al.*, 2012). Además, la transformación nuclear (Vieler *et al.*, 2012) y la sustitución dirigida de genes por recombinación homóloga (Kilian *et al.*, 2011), recientemente informada en *Nannochloropsis sp.*, abre los enfoques moleculares para estudios de genes funcionales y su respectiva ingeniería. Sin embargo, ninguna de las especies de microalgas modelo actuales son cepas de producción competitivas a gran escala. *Nannochloropsis gaditana* tiene rendimientos lipídicos altamente favorables, y es un organismo de producción prometedora; existen análisis filogenéticos que identifican atributos genéticos de este organismo, incluyendo genes de la fotosíntesis stramenophila únicas y expansiones de genes que pueden explicar los fenotipos fotoautótrofos distintivos de la especie. La disponibilidad de la secuencia del genoma y de los métodos de transformación facilita las investigaciones de biosíntesis de lípidos en *N. gaditana* y permite el desarrollo de estrategias de ingeniería genética para mejorar aún más esta microalga naturalmente productiva (Radakovits *et al.*, 2012).

En la actualidad, se está aún lejos de comprender globalmente las vías moleculares detalladas y formas de regulación del metabolismo de los lípidos en las microalgas, y es necesaria más investigación (Hu Q. *et al.*, 2008). La acumulación de lípidos en microalgas se induce fácilmente con la privación de nitrógeno, lo que proporciona una útil base experimental para observar cambios en la transcripción de genes, la síntesis de proteínas y las actividades metabólicas que prevalecen en la acumulación lípidos (Scott SA., *et al.*, 2010)

En la **tabla N°1** se detalla, mediante un estudio realizado por Radakovits *et al.*, (2012), la caracterización del genoma de *N. gaditana*. Esta secuenciación permite la identificación de los genes y las vías que están involucrados en la producción de lípidos en esta microalga, lo que acoplado al establecimiento de un método para la transformación genética, permite un análisis más detallado de los posibles cuellos de botella en la ruta de biosíntesis de TAG y el descubrimiento de dianas adecuadas para la sobreexpresión de genes y/o knockout.

Tabla N°1. Caracterización genoma *N. gaditana* (Radakovits *et al.*, 2012).

Características del genoma nuclear de *N. gaditana*

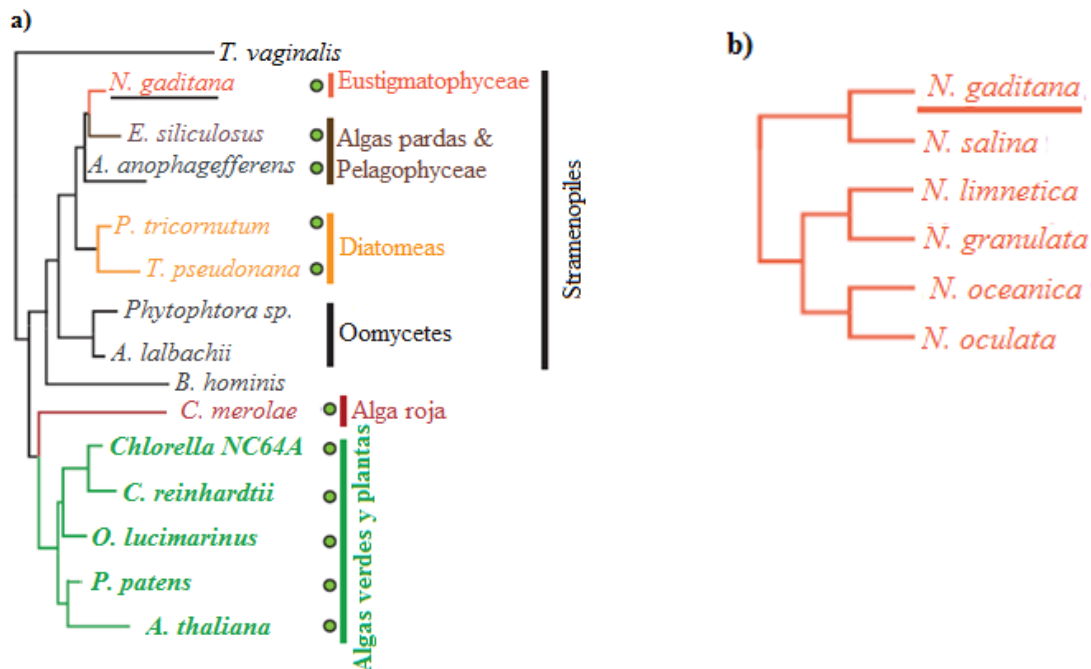
Estadísticas de ensamblaje	
Tamaño estimado de genoma	~29 Mb
Contenido G+C	54,20%
N° de scaffolds ensamblados	2087
N° de scaffolds > 100 kb	35
N° de scaffolds > 20 kb	561
N° de scaffolds > 2 kb	1447
Scaffolds N50	257
Scaffolds L50	37693 pb
N° de contigs	5823
N° de contigs > 100 kb	25
N° de contigs > 20 kb	320
N° de contigs > 2 kb	2694
Contigs N50	404
Contigs L50	15294

Características genómicas

N° de genes nucleares previstos	8892
Genes de cloroplastos	124
Genes mitocondriales	36
<u>Total de genes</u>	9052
Genes involucrados en expresión de TAG	92,30%
Genes homólogos	69,80%
Genes únicos	30,20%
Promedio longitud secuencias codificantes	1069 pb
Promedio longitud intrones	222 pb
Intrones por gen	1,62

A continuación se presenta un esquema resumen del árbol filogenético de stramenopiles y algas fotosintéticas adaptado desde Eisenreich *et al.* (2004) y Tyler *et al.* (2006). Los círculos verdes de la derecha indican las especies fotosintéticas. Este también indica la relación entre diferentes cepas de *Nannochloropsis* basado en secuencias de genes de ARN ribosomal 18S.

Figura N°1. (a) Árbol filogenético de stramenopiles y algas fotosintéticas. **(b)** Relación cepas *Nannochloropsis*.



2.3.1 Composición química de microalgas

La pared celular de las microalgas representa un 12 a 36% de la masa total de células (p/p) en diferentes microalgas. Ésta se compone principalmente de hidratos de carbono y proteínas que representan el 30 a 75% y 1 a 37% de la pared celular, respectivamente. Algunos ejemplos se ven representados en **tabla N° 2** a continuación.

Tabla N°2. Composición pared celular microalgas.

Microalga	Pared celular	Composición pared celular (%)			Referencias
	(% p/p)	Hidratos de carbono	Proteínas	n.d.*	
<i>Chlorella vulgaris</i> (F)	20.0	30.00	2.46	67.54	[Abo-Shady <i>et al.</i> 1993]
<i>Chlorella vulgaris</i> (S)	26.0	35.00	1.73	63.27	[Abo-Shady <i>et al.</i> 1993]
<i>Kirchneriella lunaris</i>	23.0	75.00	3.96	21.04	[Abo-Shady <i>et al.</i> 1993]
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	36.7	38.00	22.60	39.40	[Domozych <i>et al.</i> 1980]
<i>Ulothrix belkae</i>	25.0	39.00	24.00	37.00	[Domozych <i>et al.</i> 1980]
<i>Pleurastrum terrestre</i>	41.0	31.50	37.30	31.20	[Domozych <i>et al.</i> 1980]
<i>Pseudendoclonium b.</i>	12.8	30.00	20.00	50.00	[Domozych <i>et al.</i> 1980]
<i>Chlorella Saccharophila</i>	-	54.00	1.70	44,3	[Blumreisinger <i>et al.</i> 1983]
<i>Chlorella fusca</i>	-	68.00	11.00	20.00	[Blumreisinger <i>et al.</i> 1983]
<i>Chlorella fusca</i>	-	80.00	7.00	13.00	[Loos & Meindl 1982]
<i>Monoraphidium braunii</i>	-	47.00	16.00	37.00	[Blumreisinger <i>et al.</i> 1983]
<i>Ankistrodesmus densus</i>	-	32.00	14.00	54.00	[Blumreisinger <i>et al.</i> 1983]
<i>Scenedesmus obliquos</i>	-	39.00	15.00	46.00	[Blumreisinger <i>et al.</i> 1983]

* no determinado

Otros compuestos que se encuentran en la pared celular de microalgas son el ácido urónico, glucosamina, hidroxiprolina, prolina, esporopolenina, carotenoides y otros biopolímeros resistentes (Punnett & Derrenbacker 1966; Domozych *et al.*, 1980; Blumreisinger *et al.*, 1983; Brown 1991, 1992; Abo-Shady *et a.*, 1993). En relación a los hidratos de carbono en la pared celular de microalgas los componentes principales son azúcares neutros, celulosa y hemicelulosas. Blumreisinger *et al.*, (1983) comparó cinco diferentes microalgas en base a la composición de hidratos de carbono en la pared celular, obteniendo una prominente cantidad de azúcares neutros. En cuanto a la cantidad de celulosa y hemicelulosas oscilan entre 6 a 17% y valores estudiados en otras investigaciones afirman que este porcentaje se acerca de un 18 a 32% (Abo-Shady *et al.*, 1993; Domozych *et al.*, 1980). Por otro lado, se han informado contenidos de celulosa cercanos al 45% en la pared celular de *Chlorella pirenoidosa* (Northcote *et al.*, 1958). A diferencia de estas investigaciones no se encontró presencia de celulosa en la pared celular de

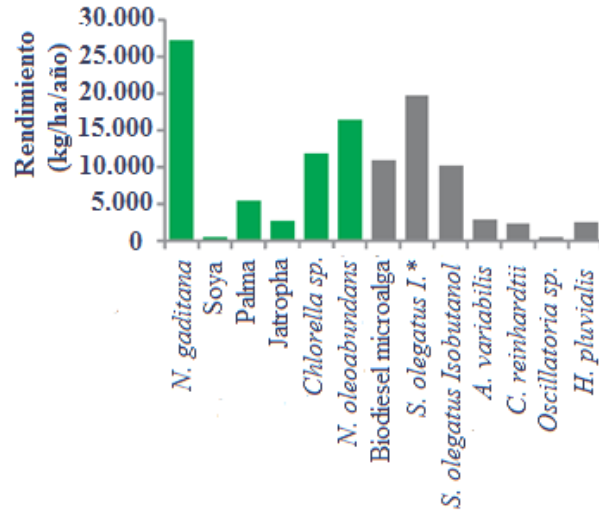
Chlorella fusca (Loos & Meindl, 1982). En relación a las proteínas y péptidos, prolina e hidroxiprolina son los componentes principales. Según Punnett & Derrenbacker (1966), la pared celular de seis diferentes microalgas solo consistieron en péptidos (composición de aminoácidos sencilla), pero no contiene ninguna proteína. Además, esta investigación reveló la existencia de prolina en la pared celular de *Chlorella vulgaris* e hidroxiprolina en la pared celular de *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus obliquos*.

2.3.2 Comparación de la composición de diferentes cepas

Reboloso-Fuentes M., *et al.*, (2001) analizó la composición nutricional de *Nannochloropsis eustigmatophyte marina spp.* La biomasa contenía dentro de su estructura un 37,6 % (p/p) de hidratos de carbono disponibles, un porcentaje de proteína cruda de 28,8 %, y presentó una cantidad de 18,4 % de lípidos totales. La concentración de minerales en 100 g de biomasa seca fue la siguiente : Ca (972 mg) , K (533 mg) , Na (659 mg) , Mg (316 mg) , Zn (103 mg) , Fe (136 mg) , Mn (3,4 mg) , Cu (35,0 mg) , Ni (0,22 mg) , y Co (<0,1 mg) . El contenido de metales pesados tóxicos (Cd y Pb) no arrojó valores significativos. En cuanto al contenido de ácidos grasos con respecto al peso seco correspondía a los siguientes porcentajes : 0,6 % de 14:00 , 5,0 % de 16:00; 4,7 % de 16:01, 3,8 % de 18:01, 0,4 % de 18:02; 0,7 % de 20:04, y el 2,2 % de 20:05. Todos los resultados de análisis de la biomasa se expresan en un peso en seco de 100 g base.

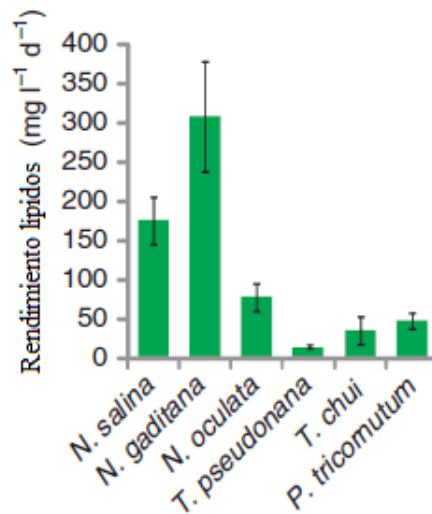
A continuación, en la **figura N°2** se observa una comparación de *N. gaditana* y sus tasas de producción a gran escala con respecto a otras plataformas de producción de biocombustibles. Las barras en verde indican las estimaciones de Radakovits *et al.*, (2012) y las barras de color gris indican las estimaciones de Atsumi *et al.*, (2009). Los valores de de 11 cultivos de *N. gaditana* se han extrapolado y ajustado por la productividad observada en ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h. Los valores de producción de *S. elongatus* (*) son de 24 h luz y serían probablemente más bajos en 12 h /12 h ciclos de luz/oscuridad.

Figura N°2. Comparación de *N. gaditana* y sus tasas de producción a gran escala con respecto a otras plataformas de producción de biocombustibles.



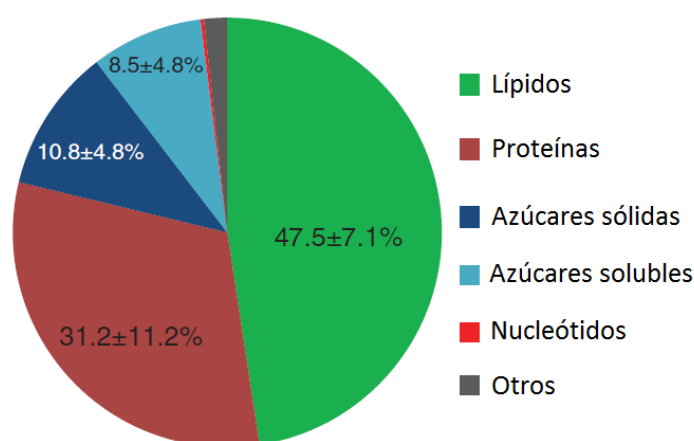
En la **figura N°3** se comparan tasas de producción de lípidos de *N. gaditana* con otras microalgas del mismo género. Los valores son de al menos tres experimentos independientes y las barras de error muestran la desviación estándar (Radakovits *et al.*, 2012).

Figura N°3. Producción de lípidos de *N. gaditana* en comparación con otras microalgas del mismo género.



El siguiente gráfico (**figura N°4**) ilustra la composición de biomasa microalgal de *N. gaditana* en el experimento de Radakovits *et al.* (2012), la que en su mayoría se compone de lípidos. Los valores representan el porcentaje con respecto a la biomasa total y son valores ideales bajo condiciones específicas las cuales incluyen exceso de nutrientes. Como se puede observar la cantidad de lípidos es notoriamente elevada, esto se debe a que se indujo una privación de nitrógeno, efecto que puede ser fácilmente controlado bajo condiciones de laboratorio.

Figura N°4. Proximal de biomasa *N. gaditana*.



La gran mayoría de los lípidos en *N. gaditana* se componen de ácido palmítico y palmitoleico con un contenido menor de ácido mirístico y ácido oleico, lo que resulta en un perfil de ácidos grasos relativamente simple y fácil de identificar. Éstos mismos ácidos grasos se pueden utilizar para la producción de biodiesel.

2.4.1 Composición química y características de aceites y biodiesel

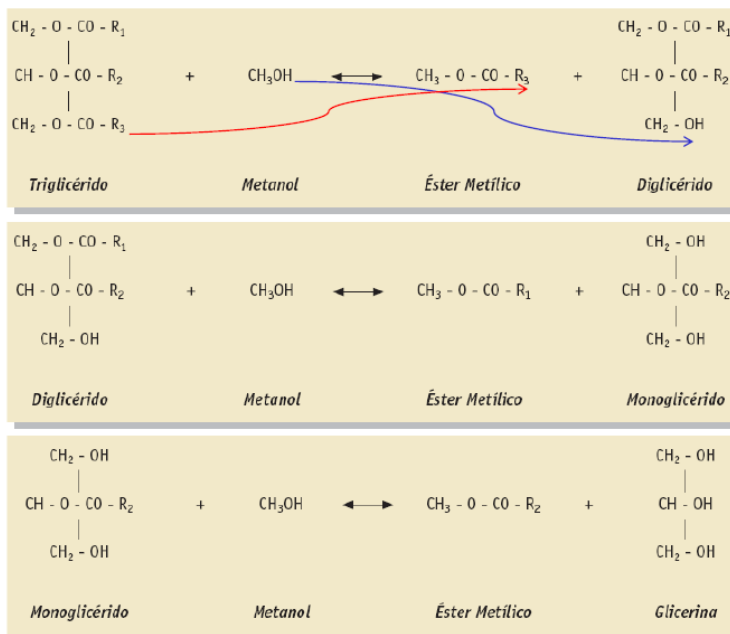
Desde un punto de vista químico, los aceites y/o biodiesel de diferentes fuentes tienen distintas composiciones de ácidos grasos. Estos varían en su longitud de cadena de carbono y el tipo y número de enlaces insaturados que contienen; se pueden clasificar en saturados o insaturados, según posean sólo enlaces químicos sencillos, o no.

Un compuesto saturado es un compuesto químico que tiene una cadena de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces simples y tiene átomos de hidrógeno ocupando las valencias libres de

los otros átomos de carbono. Por su parte un compuesto no saturado o insaturado es un compuesto químico que contiene enlaces carbono-carbono dobles o triples, los cuales indican su grado de insaturación. Los compuestos saturados y no saturados pueden contener también otros grupos funcionales. Los aceites además pueden contener ácidos grasos libres los que son ácidos grasos que tienen un grupo ácido pero que no están unidos a un alcohol.

A través de la reacción de transesterificación (**figura N°5**), cada triglicérido (TAG) se transforman en biodiesel y es técnicamente conocido como FAME (del inglés fatty acid methyl ester). La reacción consta de tres etapas consecutivas reversibles en las que el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerina gracias la reacción con alcoholes ligeros (Freedman *et al.*, 1986).

Figura N°5. Reacción de transesterificación donde se forman los metil ésteres



En una cadena de átomos de carbono, como la de un ácido graso, un enlace doble o triple provocará un estrechamiento en la cadena y un cambio en los ángulos. Estos pliegues tienen implicaciones macroestructurales y por ello poseerán diferentes propiedades.

Dichas propiedades en los aceites vegetales y sus derivados son en algunos casos muy cercanas a las propiedades de los derivados del petróleo: una mejor calidad de ignición, un contenido de energía comparables, mayor densidad, mayor seguridad (debido a su mayor punto de inflamación), el carácter no tóxico de sus emisiones de escape, el contenido de azufre casi igual a cero, combustión más limpia y su naturaleza renovable (Anand K, *et al.*, 2010). Entre las propiedades en la **tabla N°3** se encuentran viscosidad, densidad, índice de cetano, puntos de enturbiamiento y fluidez, fracciones de destilación, índice de acidez, corrosión del cobre y el poder calorífico superior (HHV) de acuerdo a las normas ISO (Demirbas A., 2008). Sin embargo las desventajas de los biocombustibles derivados de aceites vegetales son: (a) mayor viscosidad, (b) más alto punto de fluidez, (c) el punto de inflamación más alto, (d) mayor punto de enturbiamiento, (e) una mayor densidad y (f) la reactividad de la cadena de hidrocarburos insaturados. A continuación se pueden ver algunos valores característicos de biocombustibles de aceites vegetales.

Tabla N°3. Propiedades del biodiesel vegetal y su comparación con diesel convencional.

Aceite vegetal	Viscosidad (mm ² /s)	Cetano (°C)	Poder calorífico (MJ/kg)	Puntos de enturbiamiento (°C)	Punto de fluidez (°C)	Punto de inflamación (°C)	Densidad (kg/l)	Residuos carbonosos (%)
Maíz	34,9	37,6	39,5	-1,1	-40	277	0,9095	0,24
Semilla de algodón	33,5	41,8	39,5	1,7	-15	234	0,9148	0,24
Crambe	53,6	44,6	40,5	10	-12,2	274	0,9048	0,23
Semilla de linaza	27,2	34,6	39,3	1,7	-15	241	0,9236	0,22
Maní	39,6	41,8	39,8	12,8	-6,7	271	0,9026	0,24
Semilla de raps	37	37,6	39,7	-3,9	-31,7	246	0,9115	0,3
Cártamo	31,3	41,3	39,5	18,3	-6,7	260	0,9144	0,25
Sésamo	35,5	40,2	39,3	-3,9	-9,4	260	0,9133	0,24
Haba de soja	32,6	37,9	39,6	-3,9	-12,2	254	0,9138	0,25
Girasol	33,9	37,1	39,6	7,2	-15	274	0,9161	0,27
Palma	39,6	42	0	31	0	267	0,918	0,23
Babasú	30,3	38	0	20	0	150	0,946	0
Diesel	3,06	50	43,8	0	-16	76	0,855	0

Los combustibles diesel a base de petróleo poseen estructuras químicas que contienen sólo carbono y átomos de hidrógeno, que están dispuestas en cadena lineal o estructuras de cadena ramificada, como es el caso de la configuración de hidrocarburos aromáticos. Las estructuras normales de cadena lineal se prefieren por una mejor calidad de ignición (Kapur *et al.*, 1982). El combustible diesel puede contener tanto hidrocarburos saturados e insaturados, pero estos últimos no están presentes en cantidades suficientemente grandes para que la oxidación del combustible sea un problema. El diesel derivado del petróleo se compone de alrededor de 75% de hidrocarburos saturados (principalmente parafinas incluyendo n, iso, y cicloparafinas), e hidrocarburos aromáticos 25% incluyendo naftalenos y alquilbencenos (ATSDR, EE.UU., 1995). Los aceites vegetales contienen triacilglicerolos, ácidos grasos libres (generalmente de 1 a 5%), fosfolípidos, fosfátidos, carotenos, tocoferoles, azufre compuesto y rastros de agua (Markley KS, 1960). En **tabla N°4** se pueden apreciar ácidos grasos más comunes y sus nombres.

Tabla N°4. Ácidos grasos comunes.

Nombre del ácido graso	Nombre químico	Número lipídico
Laurico	Dodecanoico	12:0
Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Estearico	Octadecanoico	18:0
Oleico	Octadecanoico	18:1
Linoleico	Octadecadienoico	18:2
Linolenico	Octadecatrienoico	18:3
Araquidónico	Eicosanoico	20:0
Bohenico	Docosanoico	22:0
Erudico	Docosenoico	22:1
Lignocérico	Tetracosanoico	22:0

La **tabla N°5** ejemplifica la composición de ácidos grasos de varios cultivos vegetales. Los ácidos grasos más comunes en el aceite y grasa vegetal son estearico, palmítico, oleico y linoleico. También están presentes en varios aceites los ácidos mirístico, palmitoleico, linolénico y octadecatetranoico. (S.P. Singh & D. Singh, 2010).

Tabla N° 5. Composición de ácidos grasos de diferentes aceites vegetales

Aceite vegetal	12:0	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	20:0	20:1	22:0	24:00	18:1	22:1	18:2	18:3	18:4	Otro
Semilla de algodón				28		1					13		58			
Tabaco		0,09		10,96	0,2	3,34					14,54		69,49	0,69		0,69
Semilla de raps				3,5		0,9					64,1		22,3	8,2		
Semilla de cártamo				7,3		1,9					13,6		77,2			
Cártamo				9		2					12		78			
Girasol				6,4	0,1	2,9					17,7		72,9			
Sésamo				13,1		3,9					52,8		30,2			
Semilla de linaza				5,1	0,3	2,5					18,9		18,1	55,1		
Palma				42,6	0,3	4,4					40,5		10,1	0,2	1,1	
Palmera				35		7					44		14			
Maíz				12		2					25		6			
Soja				13,9	0,3	2,1					23,2		56,2	4,3		
Grano de maní				11,4		2,4			2,7	1,3	48,3		32,0	0,9	4,0	
Maní				11		2	1		2	1	48	0	32	1		
Grano de avellana				4,9	0,2	2,6					83,6		8,5	0,2	0	
Nogal				7,2	0,2	1,9					18,5		56,0	16,2	0	
Almendra				6,5	0,5	1,4					70,7		20,0	0	0,9	
Oliva				5,0	0,3	1,6					74,7		17,6	0	0,8	
Coco	48,8	19,9		7,8	0,1	3				4,4		0,8	0	65,7	8,9	
Babasú	48	16		10		2					14		5			5
Cumarú				23		7					37		29			4
Semilla de amapola				12,6	0,1	4					22,3		60,2	0,5		
Hoja de laurel	26,5	4,5		25,9	0,3	3,1					10,8		11,3	17,6	31	
Grano de trigo		0,4		20,6	1	1,1					16,6		56	2,9	1,8	11,4
Arroz		0,5		13,4		2	0,5			0,7	41,5		31,2			
Mahua				22,3		22,5	1,5				46		10,1			
Nim		0,24		14,8		19,4	2,6				55,3		7,4			
Aceite de camelina				5,4		2,6	0,25	16,8	1,4		14,3	2,9	2,9	38,4		
Andiroba				27	1	7					49		16			

2.4.2 Composición química del aceite de microalga

Los lípidos pueden ser definidos como cualquier molécula biológica que es soluble en un disolvente orgánico. La mayoría de los lípidos contienen ácidos grasos y generalmente se pueden clasificar en dos categorías sobre la base de la polaridad de sus grupos (Kates, 1986). Están los lípidos neutros que comprenden acilgliceroles y ácidos grasos libres (FFA), y los lípidos polares que pueden subdividirse en más grupos como los fosfolípidos (PL) y glicolípidos (GL). Los lípidos neutros se utilizan principalmente en las células de microalgas como energía de reserva, mientras que los lípidos polares en paralelo forman las membranas celulares bicapa. El acilglicerol consiste de ácidos grasos éster-enlazados a un esqueleto de glicerol y se clasifica de acuerdo con su número de ácidos grasos: los triglicéridos (TAG), diacilgliceroles (DG), monoacilgliceroles (MG). FFA o ácido graso libre, es un ácido graso unido a un átomo de hidrógeno (Halim *et al.*, 2012).

Se observa que también hay algunos tipos de lípidos neutros que no contienen ácidos grasos, tales como los hidrocarburos, esteroides, cetonas, y pigmentos (carotenos y las clorofilas). Aunque estas fracciones de lípidos son solubles en disolventes orgánicos (por lo tanto acorde a la definición de los lípidos), no son convertibles en biodiesel. Los lípidos aislados, conocidos como lípidos crudos o lípidos totales, pueden ser cuantificados gravimétricamente. El término "grasas totales" es ante todo utilizado para fines analíticos (Markley KS., 1960).

Como ya se mencionó, además de acilgliceroles, los lípidos crudos obtenidos a partir de biomasa de microalgas contienen frecuentemente lípidos polares y lípidos neutros no acilgliceroles (tales como ácidos grasos libres, esteroides, hidrocarburos, cetonas, carotenos, y las clorofilas). Desde la perspectiva de producción de biodiesel, cualquier fracción bioquímica no acilglicerol es un contaminante y tendrá que ser retirado de los lípidos crudos para eliminación o bien para someter a otras reacciones como por ejemplo esterificación de ácidos grasos libres para producción de biodiesel. Como tal, los lípidos crudos derivados de la biomasa de microalgas a menudo son sometidos a una etapa de fraccionamiento antes de que sean transesterificados, purificados por

diferentes métodos, tales como cromatografía líquida, precipitación con ácido, y cristalizaciones de urea (Medina *et al.*, 1998).

Agua, nutrientes inorgánicos, dióxido de carbono y la luz se proporcionan al cultivo de microalgas. En la etapa de recuperación, las células suspendidas en el caldo se separan de las aguas residuales y los nutrientes, que luego se reciclan a la etapa de la producción. La biomasa recuperada se utiliza para extraer el aceite de algas que se convierte después en biodiesel en un proceso separado. A veces la biomasa agotada se puede utilizar como alimento para animales y para la recuperación de otros productos de alto valor posiblemente existentes en la biomasa. La mayor parte de la biomasa se somete a digestión anaeróbica, lo que produce biogás para generar electricidad (Chisti Y., 2007).

2.5.1 Biodiesel de microalgas

El biodiesel a partir de microalgas parece ser el único biocombustible renovable que tiene el potencial de desplazar parcialmente a los combustibles de transporte derivados del petróleo sin que se afecte negativamente a la industria de los alimentos y otros productos obtenidos en base a cultivos.

Químicamente el aceite/grasa se compone de 90 a 98% de triglicéridos y pequeñas cantidad de mono y diglicéridos. Como se describía anteriormente los triglicéridos son ésteres de tres ácidos grasos y un glicerol. Estos contienen una cantidad sustancial de oxígeno en sus estructuras. Cuando tres ácidos grasos son idénticos, son triglicéridos simples, cuando son diferentes triglicéridos mixtos, que están completamente saturados y sin doble enlaces de hidrógeno. Aquellos que tienen una molécula de hidrógeno menos tienen un doble enlace entre los átomos de carbono y son llamados monosaturados. Y los que tienen más de una falta hidrógeno tienen más de un doble enlace y se llaman poliinsaturados.

Los triglicéridos totalmente saturados conducen a un exceso de depósitos de carbono en motores. Los ácidos grasos son diferentes en relación con la longitud de cadena, grado de insaturación o la presencia de otras funciones químicas. Químicamente, el biodiesel se conoce como monoalquilésteres de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos de fuentes renovable.

Esto puede ser utilizado en la compresión en el encendido de motores con poco o nada de modificaciones (Demirbas, 2002).

En la **tabla N°6** se adjuntan las especificaciones del biodiesel según el Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción de la República de Chile, el cual decreta que biodiesel es todo combustible líquido compuesto por una mezcla de ésteres alquílicos obtenidos a partir de aceites vegetales, grasa animal o aceite comestible usado, según las especificaciones que se detallan en su artículo 7°. (Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción de la República de Chile, título II, artículo 7°).

Tabla N°6. Especificaciones que debe cumplir el biodiesel en Chile

Propiedad	Unidad de medida	Valor
Densidad a 15°C	g/cm ³	mín. 0,86 máx. 0,90
Viscosidad a 40°C	mm ² /s	
	(cST=centiStokes)	mín. 3,5 máx. 5,0
Punto de inflamación	°C	mín. 120
Punto de escurrimiento	°C	máx. -1
Azufre total	% masa	máx. 0,005
Residuos de Carbono Conradson (CCR) al 100%	% masa	máx. 0,05
Contenido de ceniza sulfatada	% masa	máx. 0,02
Agua y sedimentos	% volumen	máx. 0,05
Corrosión de la lámina de cobre (3 horas, 50°C)	grado de corrosión	máx. N° 2
Valor de neutralización (valor de ácido mg KOH/g)	mg KOH/g muestra	máx. 0,5
Contenido de éster	% masa	mín. 96,5
Contenido de Metanol	% masa	máx. 0,20
Glicerina Libre	% masa	máx. 0,02
Glicerina total	% masa	máx. 0,25
Fósforo	mg/kg	máx. 10
Contenido de alcalinos (Na+K)	mg/kg	máx. 5
Contenido de Metales (Ca+Mg)	mg/kg	máx. 5
Estabilidad a la oxidación a 110°C	Horas	mín. 6

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar el contenido y caracterizar el perfil lipídico y biodiesel producido por la reacción de transesterificación directa de tres cepas de microalga aisladas de la central termoeléctrica de Tocopilla.

3.2 Objetivos específicos

- I. Determinación del contenido y perfil lipídico de 3 cepas de microalga (*N. gaditana*, *P. tricornutum* y *Tetraselmis sp.*)
- II. Producción y caracterización de biodiesel a partir de biomasa de 3 cepas de microalgas.
- III. Refinación de biodiesel obtenido para evaluar mejora de calidad del producto.

3.3 Hipótesis

- I. Las microalgas son productoras de altos contenidos de lípidos que pueden ser transformados en biodiesel por transesterificación directa.
- II. La composición de lípidos en las microalgas varía de una cepa a otra y es necesario caracterizar la composición química de cada una para evaluar la calidad de biodiesel producido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

La materia prima utilizada en el presente estudio fue proporcionada por la Universidad de Antofagasta. Las tres cepas de microalgas fueron *N. gaditana*, *P. tricornutum*, y *Tetraselmis sp.*

4.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de gases Clarus 600 acoplado a espectrómetro de masas Clarus 500T
- Rotavapor Stuart RE300db
- Estufa de secado Napco E series 5861
- Balanza analítica RadwagASzso/c/z
- Vortex Scilogex mx-s
- Centrifuga Thermo Fisher scientific sl 16r
- Sonicador Cole parmer 8848
- pH-metro Hanna HI 2221
- Mufla Quimis sx-5-12
- Manto calefactor Quimis 321 A24Z
- Agitador magnético Velp Científica
- Shaker Orbital Incubator MRC TU-400
- Sistema de extracción Soxhlet
- Equipo HPLC Agilent Technologies Mod. Quaternary, 1200 infinity series.
- Sistema de destilación fraccionado
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Perlas de ebullición
- Sistema refrigerante
- Sistema de filtración con vacío
- Papel filtro, dedal de celulosa.
- Material usual de laboratorio

4.1.2 Reactivos

- Ácido clorhídrico concentrado 37% p.a
- Celite.
- Éter de petróleo p.a. (MERCK)
- Hexano p.a. (MERCK)
- Acetona técnica
- Solución cloroformo-metanol 2:1 (MERCK)
- Solución de KOH/MeOH 0,5 M (MERCK)
- Solución KCl/MeOH 4:1 v/v (MERCK)
- n-Heptano (MERCK),
- Metilheptadecanoato
- H₂O destilada.

4.2 Metodología

El presente estudio se llevó a cabo tanto en el Laboratorio de Biocombustibles y Materiales ubicado en el Núcleo Científico Tecnológico en Biorecursos (BIOREN) como en el Laboratorio de Biodiesel; ambos emplazados y pertenecientes a la Universidad de la Frontera, Temuco-Chile.

4.2.1 Caracterización de biomasa inicial

4.2.1.1 Determinación del contenido de sólidos totales y volátiles en muestras de biomasa microalgal

1,000 ± 0,010 g de las muestras de microalgas fueron depositados en un crisol (previamente tarado en mufla a 500° C por 1h) y colocados en horno a 105° ± 2 °C hasta alcanzar peso constante con el objetivo de determinar el contenido de sólidos totales. Posteriormente, cada

crisol fue calcinado en mufla por 2 h a 550 °C para determinar el contenido de sólidos fijos totales y por diferencia los sólidos volátiles totales.

4.2.1.2 Análisis proximal de biomasas microalgales iniciales

Para la determinación de humedad se utilizó el método gravimétrico, secando a 103°C por 3 h hasta peso constante y para cenizas también se utilizó gravimetría, calcinando 550°C por 8 h. Materia grasa se midió mediante hidrólisis ácida. El contenido de proteínas se midió por el método de Kjendahl. Fibra cruda se determinó mediante una hidrólisis ácida-alcalina. Extracto no Nitrogenado se estimó por cálculo de diferencia entre 100% y la sumatoria de materia grasa, proteínas, fibra cruda y cenizas.

4.2.2 Caracterización de fracción lipídica

4.2.2.1 Extracción de lípidos en solución por metodología de Bligh and Dyer.

Mediante el uso de tubos pyrex previamente tarados (en cada uno de los cuales se incluyeron 6 esferas de vidrio de 3mm) se añadieron $1,000 \pm 0,010$ mL de muestra seca, se incorporaron 7,5 mL 1:2 (v/v) de CHCl_3 :MeOH y se llevó a vortex hasta homogenizar. Luego se sonicó por 5 minutos y se llevó a vórtex durante 1minuto cada muestra, proceso que se repitió 10 veces. Luego se agregaron 2,5 mL de CHCl_3 , y se llevó nuevamente a vórtex durante 1minuto para homogenizar. Se incorporaron 2,5 mL de agua destilada y se utilizó el vórtex (durante 1 minuto) para homogenizar. Finalmente se centrifugó a 10.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente hasta separar en 2 fases (orgánica abajo y acuosa arriba), luego se rescató la fase inferior insertando una pipeta Pasteur de vidrio con succionador tipo gotario, realizando una cuidadosa presión positiva para evitar el ingreso de las primeras fases a la pipeta. Se traspasó dicha fase orgánica a un nuevo tubo limpio y seco, cuyo peso había sido previamente registrado a fin de secar el solvente y rescatar los lípidos totales. Una vez evaporado el solvente, se registró el peso final de la muestra.

4.2.2.3 Extracción de lípidos por método Soxhlet previa hidrólisis ácida

Primero se preparó la muestra para la hidrólisis ácida donde se pesaron 3 gramos de muestra en un balón de 250 mL, a los que se le adicionaron 10 mL de agua y 10 mL de ácido clorhídrico 10 perlas de ebullición. Conectado a un sistema refrigerante, se calentó la reacción por 45 minutos, agitando a intervalos de 10 minutos. Paralelamente se preparó una suspensión que contenía 3 gramos de celite en 20 mL de agua. Una vez terminado el calentamiento, se adicionaron 1 gramo de celite y se agitó. Se procedió al filtrado con vacío por medio de un embudo Buchner con papel filtro, adicionados con suspensión de celite preparada previamente. Se secó el papel filtro con la celite y la grasa adsorbida en estufa a 105 °C por 30 minutos. Luego la grasa fue extraída por método Soxhlet.

Para la extracción de grasa por método Soxhlet y determinación de grasa total se incorporó la muestra hidrolizada y seca a un dedal de celulosa. Se colocó el dedal en el tubo de extracción y se adicionó éter de petróleo al matraz previamente tarado. Luego se extrajo la muestra con solvente por 6 a 8 horas. Cuando se completó la extracción se recuperó el solvente en rotavapor. Se secó el matraz en estufa a 105 °C por 30 minutos, se enfrió en desecador y se pesó.

4.2.2.4 Obtención de ácidos grasos por metilación de aceites (Araujo 1995)

Para la identificación y cuantificación del perfil lipídico por cromatografía es necesaria una previa metilación del aceite. Esta se realiza en dos etapas, en la primera los triglicéridos liberan los ácidos grasos libres a través de la saponificación con metilato de sodio. Posteriormente, los ácidos grasos libres son esterificados por la acción de metanol acidificado con ácido clorhídrico. Para ello se hidrolizaron 100 µl de aceite con 2 mL de KOH/MeOH 0,5 M a 100 °C por 5 minutos. A la mezcla hidrolizada se le agregaron 400 µl de HCl/MeOH (4:1 v/v) y se calentó a 100 °C durante 15 minutos. Luego de que la mezcla esterificada se enfrió, se añadieron 2 mL de agua y se extrajo con 3 mL éter de petróleo. Se agitó la muestra y se dejó reposar durante 1 minuto hasta la separación en dos fases; se retiró el sobrenadante y se guardó. Se lavó la parte

sedimentada con 3 mL de éter de petróleo y se dejó reposar para nuevamente retirar el sobrenadante y se guardó junto con el anterior. Se dejó evaporar el solvente del volumen total recuperado. Finalmente se realizó la inyección en GC/MS de acuerdo al apartado **4.2.2.5**

4.2.2.5 Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS)

Se prepararon las muestras en viales de cromatografía donde se agregaron 10 µl del aceite metilado y/o biodiesel mezclándolo con 233 µl de estándar interno metilheptadecanoato y 926 µl de n-heptano, se tapó el vial y se llevó a vórtex para luego inyectar 1 µl de la mezcla en un cromatógrafo de gases Clarus 600 acoplado a espectrómetro de masas Clarus 500T de Perkin Elmer (GC/MS), utilizando una columna capilar Elite 5-MS (95% difenil-5% dimetil), de 30 cm de largo, 0,1 µm de espesor y diámetro interno de 0,25 mm. Se usó gas helio como carrier y se usó un programa de temperatura de 50 °C por 1 minuto, calentando hasta 187 °C a una tasa de 1,1 °C/min. Temperatura del inyector 250 °C.

- **4.2.2.6 Determinación de carotenoides y clorofilas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Antes de inyectar en el equipo HPLC fue necesario un pre-tratamiento de las muestras a fin de purificarlas donde las muestras de aceite de cada microalga fueron sometidas a la técnica empleada por Gutiérrez et al. (1992) para eliminar la materia grasa. A partir de 1 gramo de aceite disuelto en 4 mL de hexano y se utilizaron columnas de extracción en fase sólida (6 mL) desechable de octadecyl (C₁₈) suministrada por J. T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, N.J.). En el acondicionamiento de la fase estacionaria se hizo pasar metanol en una cantidad de dos a tres veces el volumen de la fase. Seguidamente se hizo pasar por la columna 10 mL de hexano. A continuación se añadieron los 4 mL de hexano con la muestra de aceite disuelto y se esperó a que eluyera toda la materia grasa, adicionando para mayor seguridad unos 3 mL más de hexano. En la fracción de hexano que arrastra la materia grasa, también va incluido el β-caroteno,

que se recupera posteriormente por saponificación según el método de Mínguez et al. (1990). Una vez comprobado que no quedan restos de lípidos se procede a la elución de los pigmentos con 5 mL de acetona. La solución final de pigmentos, exenta de materia grasa, se llevó a sequedad y el residuo se disolvió en un volumen adecuado de acetona. Todas las operaciones se realizaron en total oscuridad (gracias a coberturas de aluminio), con el objetivo de evitar la degradación de los pigmentos.

Por su parte, rescatadas las fases de hexano se agregaron 10 mL de éter, y se saponifica con 10 mL de 20% KOH en metanol, y se agitó fuertemente para hidrolizar los lípidos y purificar los carotenoides. Después de 1 h, se añadió agua destilada y se mantuvo hasta que las fases se separaron. La fase acuosa se rechazó. La fase de éter se lavó sucesivamente con agua destilada a pH neutro, transferida a través de Na_2SO_4 anhidro, y se evaporó a sequedad a una temperatura por debajo de 30 °C a presión reducida. El residuo seco se disolvió en 5 ml de éter etílico.

Luego se disolvieron cada una de las muestras secas en 15 mL de acetona grado analítico HPLC de los cuales se rescataron 1 mL, cantidad que fue filtrada en jeringas b-braun inkjet de 3,5 mL haciendo pasar las muestras a través de un filtro de 0,22 mm de membrana de GVPP. Luego se prepararon viales de 1,5 mL con 15 μl de muestra filtrada más 900 μl de acetona grado analítico HPLC. El equipo utilizado fue un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) marca Agilent Technologies (Mod. Quaternary, 1200 infinity series) cuya fase móvil consiste de 3 solventes con un volumen total de 1 L cada uno: Solvente A (MeOH grado HPLC 20 mL, más 840 mL de acetonitrilo y un buffer tris-base 0,1M pH 8,0, 140 mL), solvente B (MeOH grado HPLC 680 mL más 320 mL de acetato etilo) y el solvente C (50% MeOH- H_2O ambos grado HPLC). Este equipo posee inyector automático y una columna analítica marca Waters de 4,6x400 mm; su metodología está configurada para operar a una temperatura de 30°C y cuyo software asociado es Lab Advisor LC & CE de Agilent.

4.2.3 Obtención de biodiesel a partir de 3 cepas de microalgas

4.2.3.1 Transesterificación directa de biomasa microalgal

A continuación se describe el proceso de transesterificación directa de microalgas para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos, utilizando un alcohol y en presencia de un catalizador. Tras evaluar la influencia de diferentes variables sobre el proceso de transesterificación, como lo son el tipo y la cantidad de catalizador, la velocidad de agitación, la temperatura del medio de reacción así como también las características de la materia prima utilizada, se definieron los siguientes protocolos con las condiciones a continuación descritas en la **tabla N°7**.

Tabla N°7. Condiciones experimentales de reacción de transesterificación directa de microalgas.

Protocolo	Biomasa (g)	Vol. Metanol (mL)	Vol. Ácido (mL)	Vol. Total Aprox. (mL)	T° reacción (C°)	Tiempo reacción (h)	Agitación (rpm)
A) *UFRO 1	100	500	20	620	55	5	200
B) *UFRO 2	100	500	20	620	70	5	200
C) **UFRO 1	250	250	10	510	55	5	200
D) **ALMERÍA	250	500	75	825	70	2	200

*Biomasa seca

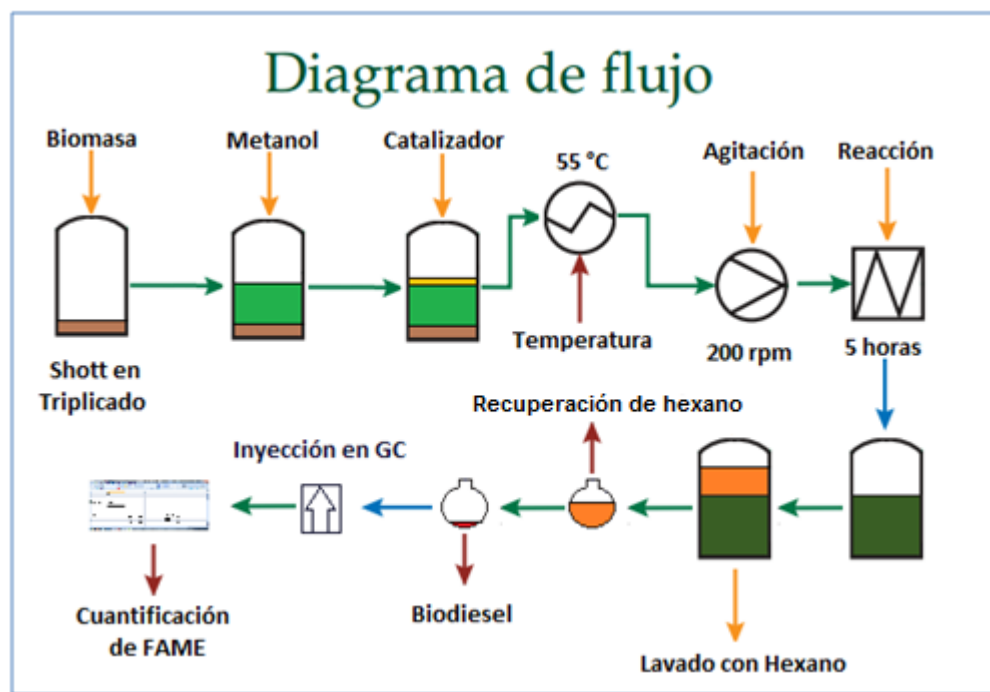
**Biomasa húmeda 80%

El uso de catalizadores ácidos permite producir FAMES utilizando materias primas con alto contenido de FFA, además al usar ácido sulfúrico los FFAs pueden ser esterificados a FAMES sin la formación de jabón.

Según las condiciones de reacción, para cada ensayo fue necesario implementar triplicados donde se utilizaron frascos de 1 L, se taró el envase y se agregaron 100 g de biomasa en las 3 repeticiones. Bajo campana de extracción, se agregaron los 500 mL de MeOH. Del mismo modo

y sobre un recipiente con agua, se agregaron 20 mL de H_2SO_4 . Fue necesario proporcionar el ambiente frío y realizar la incorporación lentamente ya que se provoca una reacción exotérmica lo que tiende a elevar precipitadamente la temperatura de la misma. Una vez agregados el metanol y el ácido (siempre en ese orden) la reacción se sometió a agitación constante en un agitador orbital con control de temperatura por un período de 5 horas a un total de 200 rpm a una temperatura de 55° . Posterior a la reacción de 5 horas se dejaron enfriar los frascos para luego agregar 300 mL de hexano y se dejó reposar por períodos de 8 horas. Cada lavado se realizó posterior a la extracción de la fase hexánica de la reacción donde se retiraron casi la totalidad de los 300ml de hexano y se repusieron otros 300 mL del mismo. Una vez realizados entre 9 y 10 lavados se dejó secar la biomasa agotada en un horno de secado. Mediante el uso de un rotavapor, se rotaron los lavados de hexano para recuperar el solvente y separar el biodiesel contenido en él. Se tomaron los datos de peso y volumen del total de biodiesel recuperado. Se tomó una muestra de cada repetición y ensayo para inyectar en GC como lo indica el apartado 4.2.2.5. A continuación se grafica el diagrama de flujo de la reacción de transesterificación en la **figura N°6**.

Figura N° 6. Transesterificación directa protocolo UFRO.



4.2.3.2 Neutralización del biodiesel obtenido a partir de microalgas

Se usaron 250 mL de biodiesel de microalga y con el fin de reducir su acidez fueron disueltos en igual cantidad de de cloroformo. Luego se agregó 250 mL de agua destilada y se realizó una separación líquido-líquido. La fracción de cloroformo (fase orgánica) se separó de la solución acuosa. En la interfase se formó un precipitado que quedó contenido en la fracción acuosa, el cual se centrifugó, rescatando la fracción de cloroformo y guardando el precipitado. Se midió el pH de la solución acuosa, y se repitió el mismo procedimiento hasta que la fase acuosa alcanzó el pH del agua (pH agua destilada), aproximadamente pH 5,5. Dichas repeticiones alcanzaron un número de 25 ± 2 lavados para estabilizar el pH desde 2 a 5,5.

Figura N°7. Neutralización de biodiesel de microalgas.

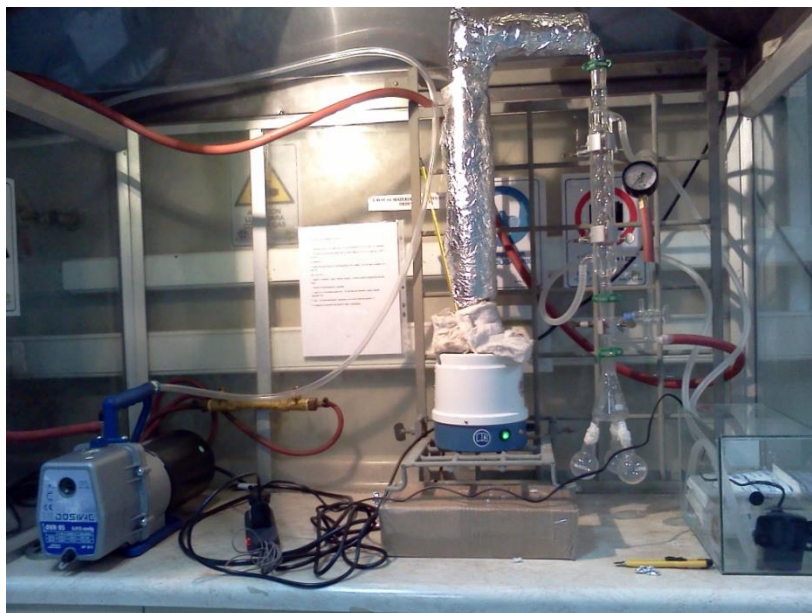


4.2.3.3 Refinación de biodiesel obtenido a partir de microalgas

Para la refinación de biodiesel se utilizó la destilación fraccionada al vacío. La destilación se llevó a cabo en balón de 500 mL donde se depositaron 170 mL de biodiesel. Para poner a punto la destilación y el equipo a utilizar se realizaron experimentos de destilación de biodiesel de raps. El equipo incluye un termómetro para monitorear la temperatura en el interior del sistema, una

manta calefactora para balones de 500 mL y un matraz receptor de 3 bocas conectado a un manómetro de vacío y un condensador. Conectada al condensador hay una bomba de vacío la cual se ajustó a 30 ± 5 mmHg. Se recogió la primera fracción de destilado de FAME a 140-180°C, y la destilación se terminó cuando ya no quedaba más destilado pasando por intervalos de 200°C, 220°C y 240°C. Se registraron los contenidos de FAMEs en muestras iniciales, residuos y destilados para evaluar la eficiencia de la destilación. Una vez determinada las condiciones de funcionamiento del equipo se procedió a realizar la destilación de biodiesel de *N. gaditana* (muestra que se tenía en mayor cantidad).

Figura N°8. Equipo de destilación fraccionada.



5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Caracterización de biomasa inicial

5.1.2 Análisis proximal de biomásas microalgales iniciales

El diseño del presente estudio considera la comparación de las características principales de cada una de las microalgas estudiadas, para ello fue necesario realizar análisis proximales previos a la evaluación de la capacidad productora de biodiesel de cada cepa; lo anterior se detalla en las **figuras 9,10 y 11**. Los resultados obtenidos en los análisis proximales preliminares sugieren una irregularidad en la cantidad porcentual de los componentes en cada cepa.

La cantidad de proteína fue baja (25,58%) en *Tetraselmis sp.* considerando el total de la biomasa microalgal. En *N. gaditana* los valores de proteínas alcanzan un 31,07%; como afirma J. Camacho-Rodríguez *et al.* (2013) esta microalga es de especial interés para acuicultura ya que tanto lípidos como proteínas aumentan de manera igualitaria dependiendo las condiciones de cultivo, por ejemplo existe un aumento en ambos inducido por el estrés por privación de nitrógeno. En el caso de *P. triornutum* fue alto ya que corresponde a un 42,08% de la biomasa total de la microalga lo que supone un alto valor para obtener productos en base a su nivel proteico. Sin embargo las especies más comunes usadas en acuicultura no incluyen *P. triornutum* siendo las más comunes *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Spirulina*, *Phaeodactylum*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Chlorella*, y *Thalassiosira*, según publican Pulz y Gross (2004).

En cuanto al extracto no nitrogenado este valor nos indica la cantidad aproximada de hidratos de carbono disponibles. Se observaron valores muy similares en *N. gaditana* y *P. triornutum* (22,82% y 22,11% respectivamente), lo que se puede atribuir a que ambas pertenecen a la división de las *Heterokontophyta* cuya característica es la poca o ausente síntesis de almidón (en *N. gaditana* es nula). Por su lado *Tetraselmis sp.* (perteneciente a la división *Chlorophyta*) posee un

valor más elevado correspondiente al 33,78% de la biomasa total, valor que sobrepasa lo reportado por autores como M.R. Brown *et al.*, (2008) el cual promedia un 26% de carbohidratos.

El contenido de cenizas fue muy alto en la mayoría de los casos, donde *P. tricornutum* presenta el porcentaje más bajo con un 17,47%. *N. gaditana* y *Tetraselmis sp.* presentan los valores más altos con un 25,52% y un 27,34% respectivamente. Valores igualmente altos se han reportado para estas especies de microalgas marinas, por ejemplo, 20,2% de cenizas en *Phaeodactylum tricornutum* (Markovits, A., *et al.*, 1991) y 21% en *Tetraselmis Chui* (Cañizares, R. O., *et al.*; 1994). Las algas de agua dulce suelen mostrar cifras más bajas de ceniza, por ejemplo, 6-15% en *Snedesmus* y *Spirulina* respectivamente (Becker, E. W., *et al.*, 1982).

Por otro lado, la materia grasa representa la cantidad de lípidos totales presentes en cada cepa; coincidentemente con otros reportes *N. gaditana* presenta un valor de 15,08% por ejemplo M.M. Reboloso-Fuentes *et al.* (2001) reporta un valor de 18,4% siendo este un valor bastante alto, sin embargo, el potencial de *N.gaditana* puede llegar hasta valores cercanos al 50% como afirma Radakovits *et al.*, 2012. Esta microalga es famosa por poseer una producción de lípidos directamente proporcional a la edad del cultivo, factor que puede ser determinante según autores como Hu *et al.* (2008) y Xu *et al.* (2008).

Tetraselmis sp. a pesar de ser conocida por generar porcentajes de lípidos más altos, mostró solo un 6,89%; Renaud *et al.* (1999) reporta valores mayores por sobre 15% y R. Huerlimann *et al.* (2010) un promedio de 11% de lípidos. Esta microalga se considera un fitoplacton y sus cantidades de lípidos la hacen apetecible para organismos marinos.

P. tricornutum por su parte posee un 9,82% de lípidos totales, valor también bajo comparados con los 20-30% reportados por Y. Chisti (2007).

Figura N° 9. Componentes cepa *N. gaditana*.

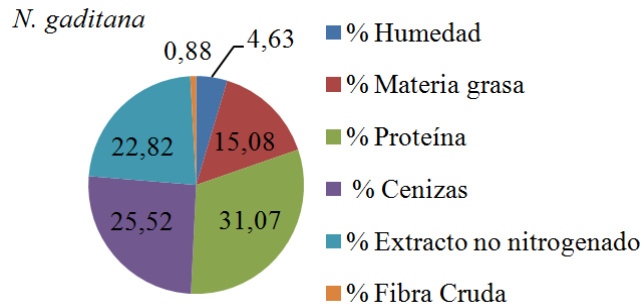


Figura N° 10. Componentes cepa *P. tricornutum*.

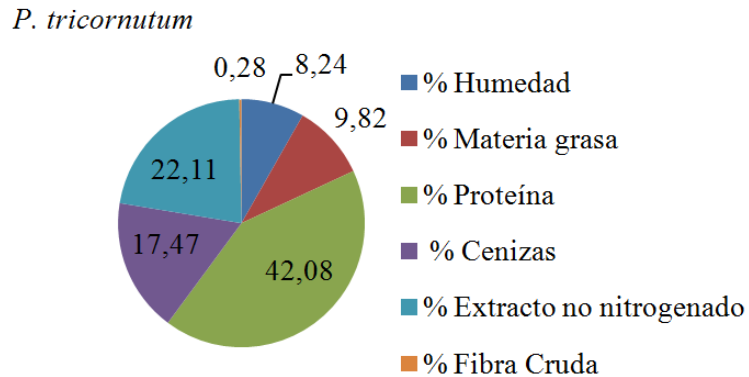
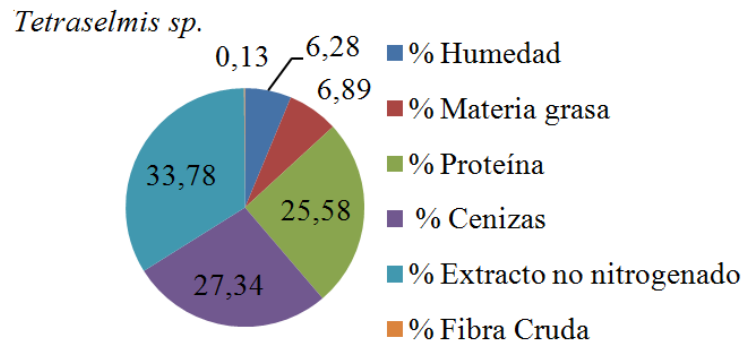


Figura N° 11. Componentes cepa *Tetraselmis sp.*



Cabe destacar que la mayoría de los estudios anteriores a la última década se centraron principalmente en el contenido de lípidos como una forma para evaluar el valor nutricional de los diferentes microalgas especies (Renaud *et al*, 1999;. Behrens & Kyle, 1996; Zhukova & Aizdaicher, 1995). Sólo en los últimos 9-10 años los estudios comenzaron a centrarse más en la productividad de los lípidos para producción de biodiesel (Griffiths & Harrison, 2009; Gouveia

et al, 2009;. Chiu et al, 2008).

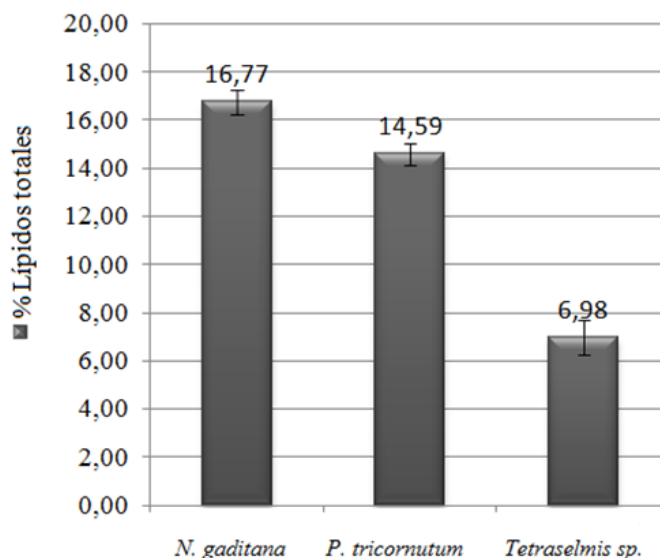
5.2. Extracción de lípidos en solución por metodología de Bligh and Dyer (B&D)

En concordancia con los análisis proximales el porcentaje de lípidos extraídos mediante el método Bligh and Dyer en dos cepas presenta valores idénticos. En la **figura N°12** se observan los resultados de la extracción de lípidos totales donde *N. gaditana* tiene un contenido de 16,77%, esto concuerda con la bibliografía donde Reboloso-Fuentes et al. (2001) indicó que *N. gaditana* tenía un porcentaje de 18,4%.

La cepa *Tetraselmis sp.* mostró también un valor muy similar al proximal con 6,98% y 6,89% respectivamente. Sin embargo estos valores están muy por debajo de valores que informa Y. Chisti (2007) de entre un 15-20%.

P. tricornutum escapa a esta tendencia de similitud reportando resultados de 14,59% de lípidos, valor mucho más alto que el 9,82% del proximal. Este valor se acerca al reportado por Y. Chisti (2007) que indica que su contenido se encuentra entre los 20-30%.

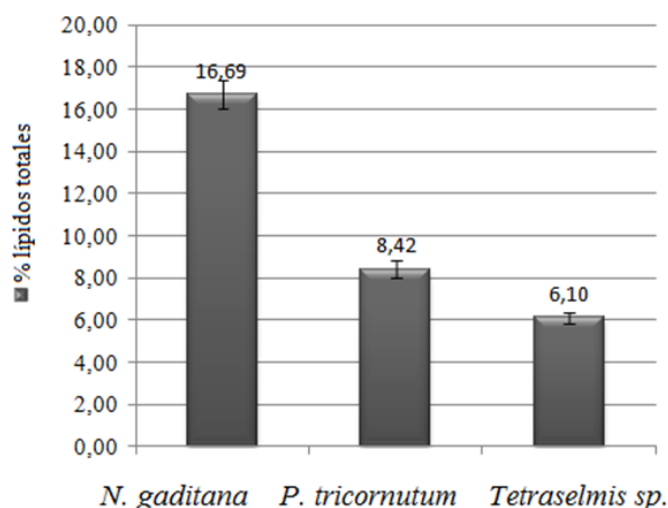
Figura N°12. Lípidos totales extraídos mediante metodología de Bligh and Dyer.



5.4 Extracción de lípidos por método Soxhlet previa hidrólisis ácida

El porcentaje de lípidos obtenidos mediante el método de extracción por Soxhlet previa hidrólisis ácida es similar a los análisis proximales, esto se debe a que usan el mismo método; *N. gaditana* alcanza un valor de 16,69% levemente superior al 15,08% del análisis proximal. La cepa *P. tricornutum* también sigue esta tendencia aunque obteniendo menor porcentaje ya que alcanza un valor de 8,42%. *Tetraselmis sp.* arrojó también un valor muy similar al proximal cuyos valores son 6,10% y 6,89% respectivamente. Dichos porcentajes se ven reflejados en la **figura N°13**.

Figura N°13. Lípidos totales extraídos por método Soxhlet previa hidrólisis ácida.



Dicho porcentaje entonces obedece a un orden donde la microalga con mayor cantidad de lípidos totales es *N. gaditana*, seguida de *P. tricornutum* y en menor cantidad siempre *Tetraselmis sp.*. La acumulación de lípidos puede ser desencadenada y/o mejorada en la mayoría de las algas gracias a la privación de nitrógeno u otras condiciones de estrés. En el experimento de Radakovits *et al.*, 2012 se atribuye un alto contenido de lípidos (47,5%) al rápido agotamiento de nitrato en cultivos densos durante el crecimiento.

El alto contenido en lípidos es a menudo compensado por menores tasas de crecimiento. Las tasas de crecimiento más bajas y/o células de tamaños pequeños conducen a disminuir la

productividad global según afirma Rodolfi *et al.* (2009). Por lo tanto, el contenido de lípidos por sí solo no sería suficiente para medir para el rendimiento, sobretodo si lo que estamos buscando es generar biodiesel a partir de estas biomásas ya que de ese porcentaje de lípidos totales hay que discriminar cuáles de ellos son metilables o no.

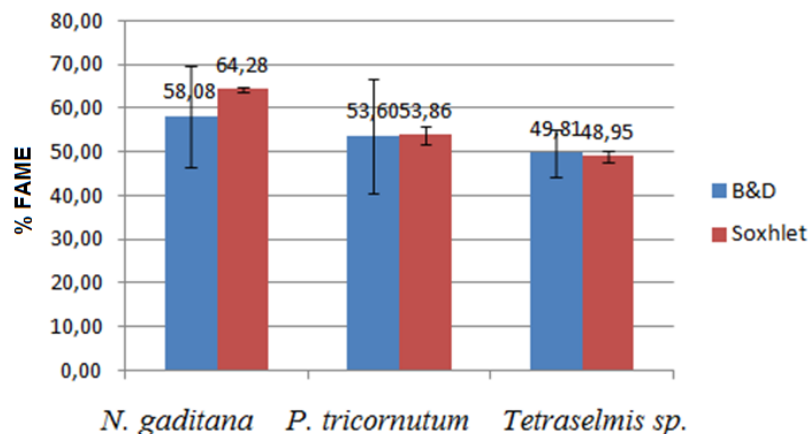
5.5 Medición de ácidos grasos por metilación de aceites e inyección en GC

Teniendo los valores correspondientes a la totalidad de los lípidos presentes en cada cepa, como enuncian Banerjee *et al.*, (2002); Metzger y Largeau, (2005); Guschina y Harwood, (2006) dependiendo de la especie las microalgas producen muchos diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos. Es así que fueron determinados los porcentajes de FAME presentes los lípidos totales obtenidos. En la **figura N°14** se aprecia la comparación entre los FAME obtenidos por dos de los experimentos de extracción.

Si bien la desviación estándar del experimento de B&D es mucho más amplia que las obtenidas en los resultados de extracción Soxhlet, aun así los rangos concuerdan con el segundo experimento el cual muestra valores muy similares en *P. tricornutum* con una aproximación de 53% de FAME en ambos experimentos y en *Tetraselmis sp.* cercanos al 49% de FAME.

N. gaditana por su parte, en el aceite obtenido por B&D muestra un contenido promedio de 58,08% de FAME. Éste varía en un amplio rango desde 47% hasta 69%. El aceite obtenido por método Soxhlet por su parte coincide con este rango mostrando un valor de 64,28% de FAME.

Figura N°14. Porcentaje de FAME de aceites obtenidos en extracciones Bligh and Dyer y Soxhlet (previa hidrólisis ácida).



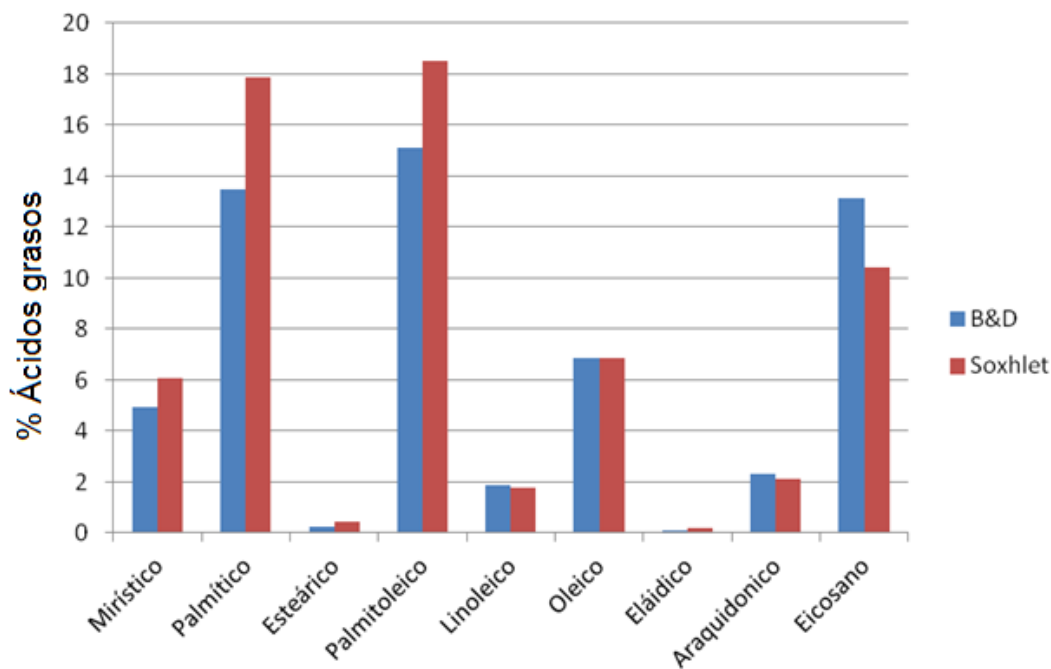
5.6 Perfil de ácidos grasos metilados de lípidos totales.

Los aceites de microalgas difieren de la mayoría de los aceites vegetales siendo bastante ricos en ácidos grasos poliinsaturados con cuatro o más dobles enlaces (Belarbi *et al.*, 2000). Por ejemplo, soy muy comunes el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20: 5n-3; cinco dobles enlaces) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22: 6n-3, seis dobles enlaces). La presencia de FAME con 4 o más dobles enlaces son susceptibles a la oxidación durante el almacenamiento y esto reduce la calidad del biodiesel. Algunos aceites vegetales también se enfrentan a este problema como por ejemplo, el aceite de canola (o raps) que contiene grandes cantidades de ácido linoleico (C18: 2n-6; dos enlaces dobles) y ácido linolénico (C18: 3n-3; tres enlaces dobles).

En la **figura N°15** se puede observar una clara diferencia entre los porcentajes de ácidos grasos entre ambos métodos de extracción. La cantidad de ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18H36O2) obtenido en el método de extracción Soxhlet representan el aumento del porcentaje de ácidos grasos saturados de 32,13% (del contenido total de FAME en el aceite de

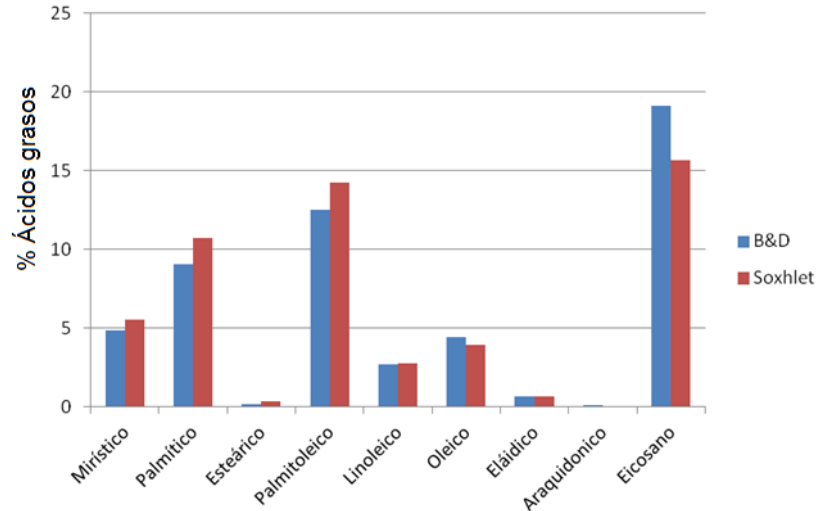
microalga) a un 37,90%. Por otro lado se observa una menor obtención de ácido poliinsaturado eicosapentaenoico en el método de extracción Soxhlet que en el B&D.

Figura N°15. Detalle porcentaje ácidos grasos para cada método de extracción cepa *N. gaditana*.



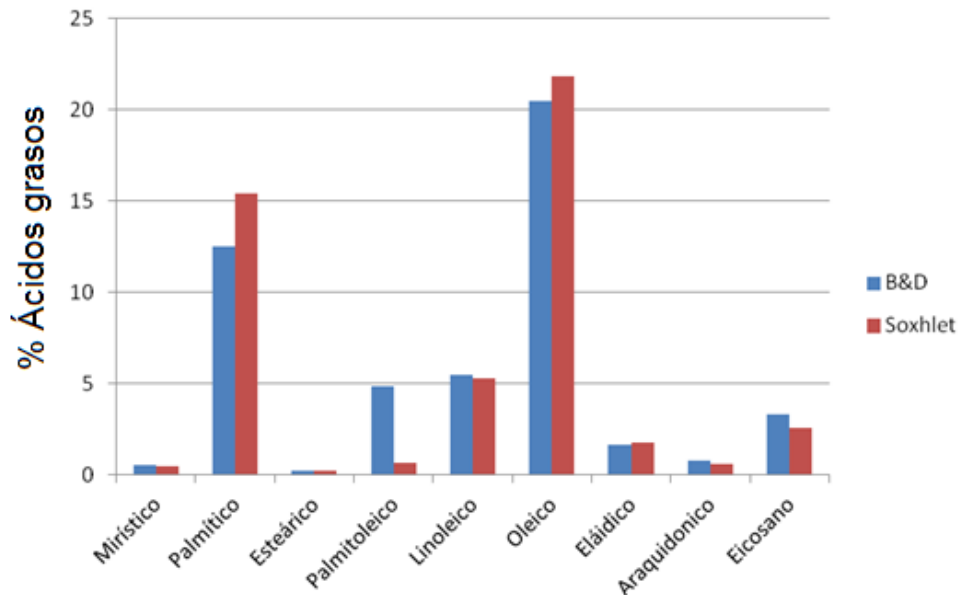
Por su parte la cepa *P. tricornutum* en la **figura N°16** mostró un perfil lipídico similar a *N. gaditana*. El contenido de ácidos grasos saturados en ambas cepas aumentó desde un 26,27% respecto del total de FAME detectados, a un 30,82%. De igual manera se observa una menor obtención de ácido poliinsaturado eicosapentaenoico en el método de extracción Soxhlet que en el B&D.

Figura N°16. Detalle porcentaje ácidos grasos para cada método de extracción cepa *P. tricornutum*.



En la **figura N°17** se aprecia el perfil para la cepa *Tetraselmis sp.* Este muestra que el contenido de ácido oleico (C18:1) aumentó con respecto a la concentración de los otros ácidos grasos; esta característica es propia de los aceites vegetales donde por lo general abunda este ácido monoinsaturado. Como afirma R. Huerliman *et al.*, (2010) el ácido oleico aumenta con la edad del cultivo de microalgas *Tetraselmis sp.* y al igual que este autor las cantidades de ácido palmítico, oleico, y linoleico componen un 85-90%. En cuanto a la diferencia entre los métodos de extracción si bien sólo existe un aumento en el ácido palmítico (C16:0) de igual manera se ve reflejado un aumento de 26,72% a un 32,98% de los ácidos saturados obtenidos del 100% de FAME.

Figura N°17. Detalle porcentaje ácidos grasos para cada método de extracción cepa *Tetraselmis sp.*



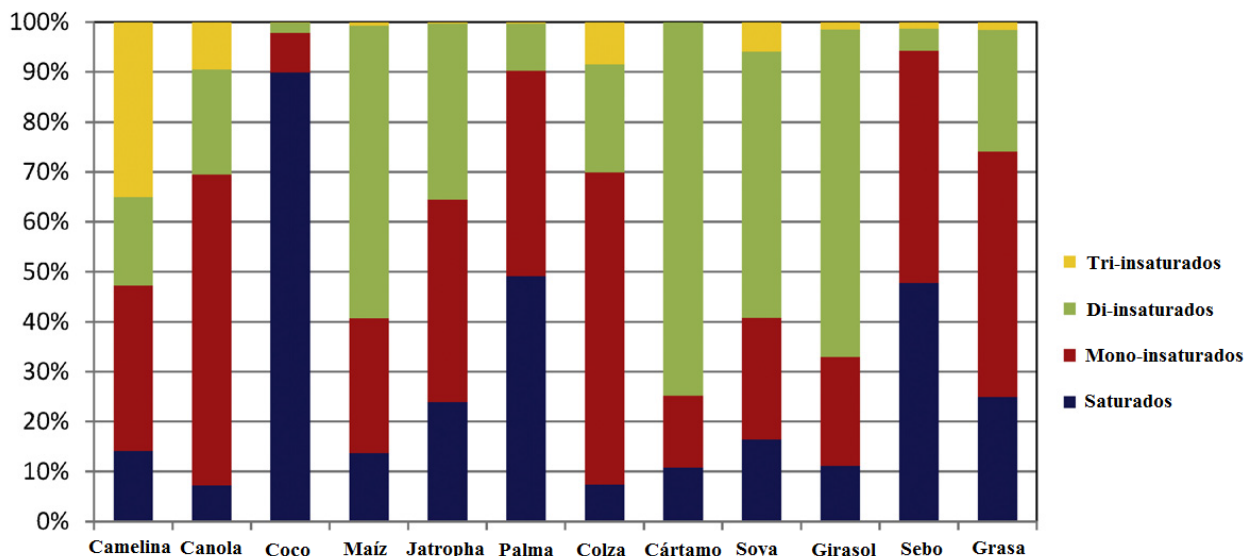
En el común de las microalgas como ya hemos explicado, el estrés por ausencia de nitrógeno genera un aumento en los lípidos totales. Según bibliografía específicamente se ve favorecido el aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados, especialmente de los ácidos mirístico (14:0) y palmítico (16:0). El cambio de acumulación de carbohidratos a lípidos ocurre muy rápido en las diatomeas (como *P. tricornutum*), sin embargo esos mecanismos que aún no están bien clarificados.

Durante las primeras etapas de crecimiento de los cultivos de microalgas, éstas producen un alto monto de lípidos polares y ácidos grasos poliinsaturados. En la fase de crecimiento estacionario se presentan ácidos grasos oleico (18:1) y palmítico (16:0). En el caso de las algas verde azuladas, la composición de lípidos y ácidos grasos, muestra sólo pequeños cambios durante el ciclo de crecimiento. Pero no sólo la nutrición influye en la composición lipídica, sino que otros factores como la luz incrementan la formación de poliinsaturados o las bajas temperaturas incrementan la síntesis de estos ácidos grasos.

El contenido de glicerol es también influenciado por las condiciones del cultivo, particularmente las concentraciones de NaCl, donde los resultados muestran una relación inversamente proporcional a la concentración de sal respecto al contenido de glicerol.

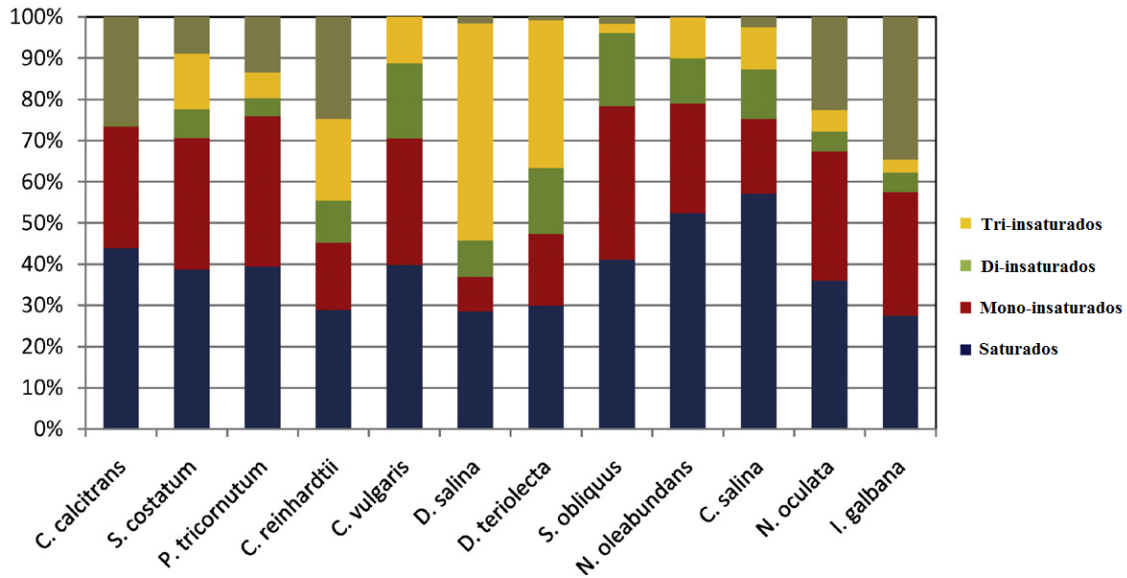
Como se aprecia en la **figura N°18** informada por S. Kent Hoekman *et al.*; (2012) los perfiles de composición de los aceites vegetales comunes están dominados por cinco ácidos grasos: palmítico (16:00), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), y linolénico (18:3). El aceite de coco es significativamente diferente, ya que contiene grandes fracciones de ácidos grasos saturados, especialmente láurico (12:00) y mirístico (14:00). Camelina también es algo diferente de la mayoría de otros aceites vegetales, con el ácido linolénico (18:3) siendo su mayor constituyente único, junto con otras cantidades más pequeñas de ácidos grasos poliinsaturados, 20:01 y 22:01.

Figura N°18. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en algunos cultivos vegetales y en grasa animal (S. Kent Hoekman *et al.*; 2012).



Por su parte las microalgas tienen una variada composición dependiendo de las diferentes especies. Este mismo autor detalla algunas especies de microalgas que tienen niveles mucho más altos de insaturación (especialmente poliinsaturación) comparado con aceites vegetales. En la **figura N°19** se detalla el perfil de ácidos grasos para algunas microalgas encontradas en bibliografía.

Figura N°19. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en algunos especies de microalgas (S. Kent Hoekman *et al.*; 2012).



De acuerdo a los resultados obtenidos para *N. gaditana*, su aceite contiene alrededor de un 60% de FAME lo que sugiere un 40 % de lípidos no transesterificables y que no contribuyen a una buena composición de biodiesel como se explicaba en los antecedentes generales, los cuales incluso pueden constituir un contaminante. Algunos tipos de lípidos neutros que no contienen ácidos grasos, tales como los hidrocarburos, esteroides, cetonas, y pigmentos (carotenos y las clorofilas) son solubles en disolventes orgánicos al igual que los triglicéridos (por lo tanto acorde a la definición de los lípidos), pero no son convertibles en biodiesel. Sin embargo algunos de ellos como los pigmentos también pueden ser aprovechados como compuestos de alto valor agregado y que gracias a refinación del producto pueden ser aislados garantizando la mejora en el producto final de transesterificación y recuperando un nuevo subproducto.

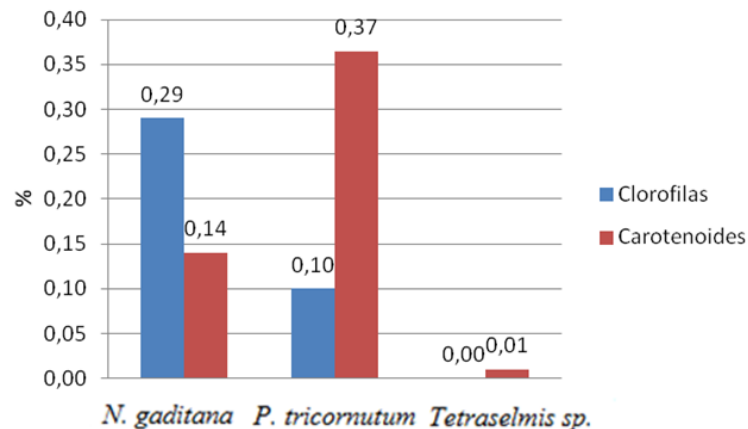
5.7 Determinación de carotenoides y clorofilas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El colorido característico de las microalgas deriva de sus pigmentos, que absorben la luz visible e inician la reacción de fotosíntesis. Las tres clases principales de pigmentos que aparecen en las algas son clorofilas, carotenoides y ficobilinas. La clorofila como pigmento primario en todo organismo fotosintético absorbe la mayor cantidad de energía a partir de las longitudes de onda azul-violeta y la luz de color rojo anaranjado.

Como enuncia Hall y Rao, (1999), dependiendo de las especie de microalga también se incluyen otros tipos de pigmentos que incluyen clorofila b (también se han reportado c y d en diferentes tipos de algas), carotenoides (como el β -caroteno en la mayoría de las algas) y ficobilinas (en cianobacterias y algas rojas).

Como se mencionó anteriormente, en las microalgas *N. gaditana*, *P. tricorutum*, y *Tetraselmis sp.* contienen un porcentaje de lípidos no transesterificables. Por esta razón se busca analizar la composición del aceite y biodiesel obtenido para determinar si parte de los lípidos no transesterificables corresponden a carotenoides o clorofilas detallados en la **figura N° 20**.

Figura N°20. Porcentaje pigmentos presentes en aceites de 3 cepas de microalgas.



N. gaditana se caracteriza por la ausencia de la clorofila b, que es un fenómeno común dentro de la clase Eustigmatophyceae así como la composición de los pigmentos xantofilos celulares como afirman Whittle, S.(1975) y Volkman, J. K. (1993). En cuanto a la composición de carotenoides de *Nannochloropsis* es relativamente simple, mayormente contiene β -caroteno, violaxantina, y vaucheraxantina, lo que se confirma en el estudio hecho por Karlson, B. *et al.* (1996) realizado en microalgas marinas. Existen otros carotenoides detectables como por ejemplo la zeaxantina y la anteraxantina los que se pueden generar en cultivos expuestos a una alta intensidad de luz.

En el presente estudio *N. gaditana* mostró porcentajes de clorofilas en el total de aceite de un 0,29%, donde el mayor porcentaje lo presentó la feofitina *a* seguido de clorofila *a*. El valor total obtenido coincide con el reporte de M. M. Reboloso-Fuentes, *et al.*;(2001) el cual también da un 0,29%, sin embargo en su estudio la clorofila *a* fue la dominante. Considerando el mismo estudio también son comparables los porcentajes de carotenoides determinados. Este autor reporta un rango desde 0,04 hasta 0,1% de carotenoides, cercano al 0,14% obtenido en el presente estudio. Sin embargo los mayores porcentajes de carotenoides corresponden al β -caroteno lo que concuerda con la literatura pero no con el estudio de este autor quien obtuvo más porcentaje de violaxantina y valores escasos de β -caroteno. Se detectaron además altos porcentajes de luteína y *a*-caroteno y en menor medida neoxantina y violaxantina.

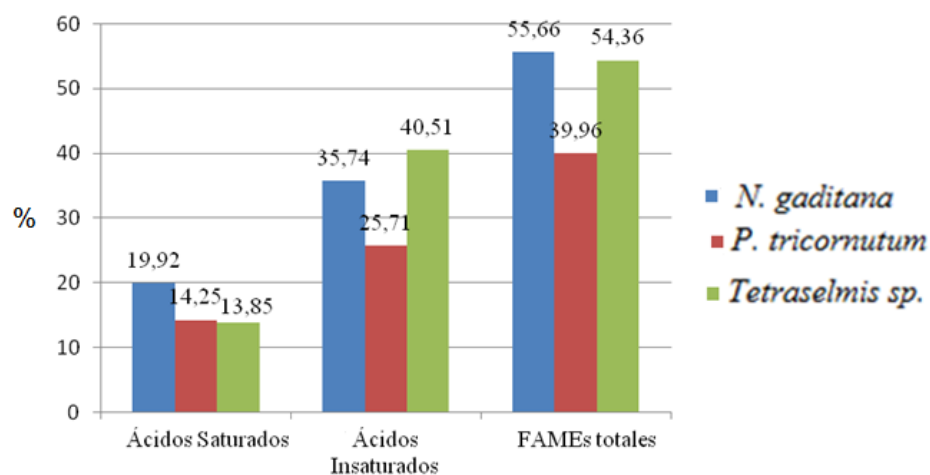
El caso de *P. tricornutum* es muy diferente porque contiene mayor cantidad de carotenoides (0,37%) que clorofilas (0,10%). Dentro de la composición de carotenoides el que está en mayor cantidad es el *a*-caroteno, seguido del β -caroteno, un porcentaje un poco menor de zeaxantina y valores escasos de luteína, violaxantina y neoxantina.

Tetraselmis sp. mostró ausencia de clorofilas y baja concentración de carotenoides, conteniendo un 0,01% compuesto por β -caroteno y luteína.

5.8.1 Obtención de biodiesel a partir de 3 cepas de microalgas.

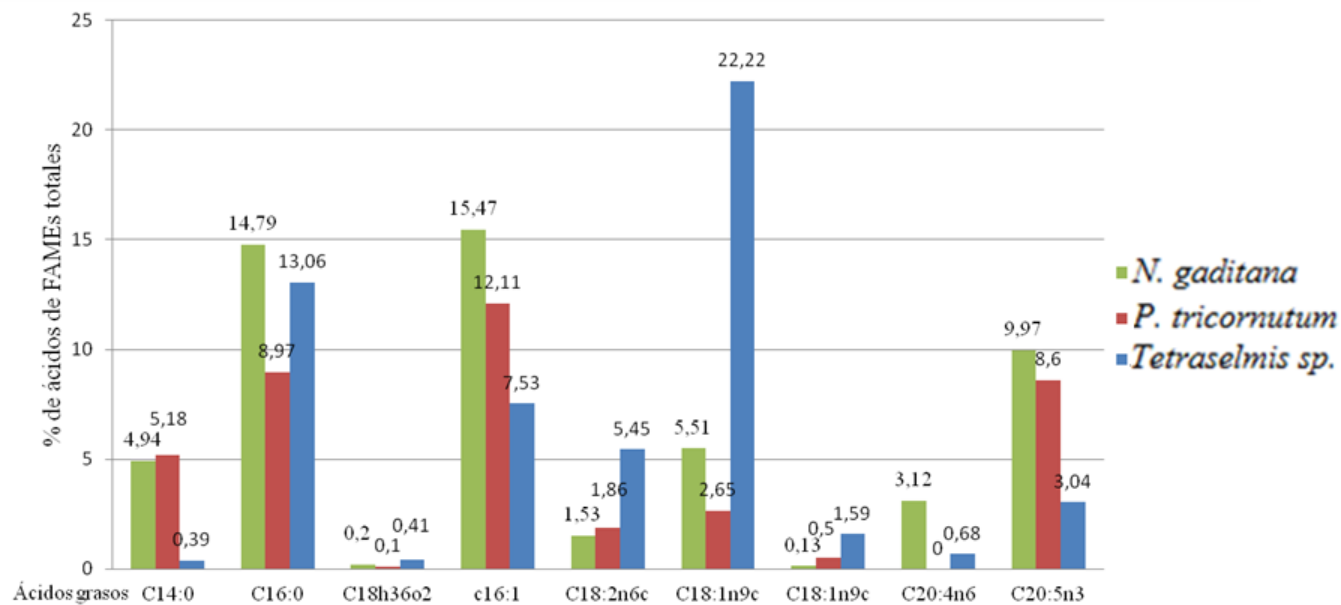
Tras la transesterificación directa de cada microalga se obtuvieron porcentajes con respecto a peso seco de 15,89% para *N. gaditana*, 10,46% para *P. tricornutum* y 7,39% para *Tetraselmis sp.* Para determinar el porcentaje de conversión de la reacción de transesterificación directa y la composición de biodiesel obtenido, se analizó muestra biodiesel por GC/MS. De esta forma, se puede comparar el perfil de ácidos grasos entre las diferentes cepas. En la **figura N°21** se comparan los porcentajes de ácidos grasos saturados e insaturados.

Figura N°21 Porcentaje ácidos grasos en biodiesel microalgas.



Al igual que en los ensayos de extracción se puede ver específicamente los porcentajes de cada ácido graso componente de cada biodiesel de microalga. Se resumen en la **figura N°22** donde se puede observar la coincidencia con respecto a los perfiles observados en los aceites metilados de cada microalga ya que en las tres cepas el ácido saturado más abundante es el palmítico (C16:0) seguido por el mirístico (C14:0) en el caso de *N. gaditana* y *P. tricornutum*. *Tetraselmis sp.* por su parte presenta gran cantidad de ácido oleico al igual que en los perfiles observados en los aceites metilados.

Figura N°22. Porcentaje ácidos grasos en biodiesel microalgas comparativos en las 3 cepas.



5.8.1 Porcentaje de rendimiento producción de biodiesel

En la **tabla N°8** se observan los porcentajes de rendimiento de cada una de las reacciones de transesterificación realizadas a las distintas cepas donde el valor obtenido en los FAME generados tras la metilación de los aceites que contenían los lípidos totales de cada biomasa, se consideran como un 100% de FAME a obtener desde el aceite. El porcentaje de FAME obtenido no debe superar ampliamente los ácidos grasos obtenidos desde el aceite lo que quiere decir que la extracción del aceite no fue totalmente efectiva y/o la metilación del mismo. Como se muestra en la tabla tanto *P. tricornutum* como *N. gaditana* presentaron valores ideales en el porcentaje de rendimiento, en el caso de la segunda esta bordea el 96% lo que muestra que fue una buena transesterificación y/o una microalga más estable de transesterificar. *Tetraselmis sp.* por su parte evidencia una falla en la extracción del aceite y/o metilación ya que supera el 100% de rendimiento.

Tabla N°8. Porcentaje de rendimiento reacciones de transesterificación.

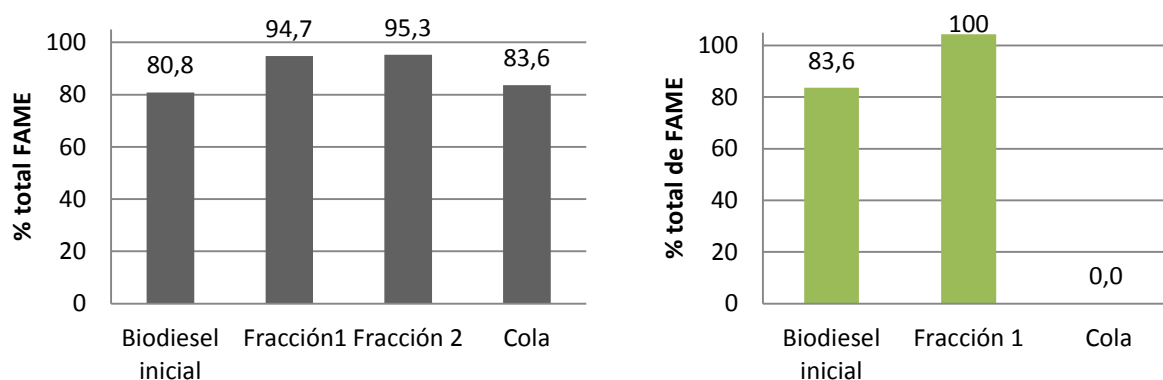
Cepa	% FAME aceites metilados	% FAME biodiesel	% Rendimiento
<i>P. tricornutum</i>	53,6	39,96	74,55
<i>N. gaditana</i>	58,08	55,65	95,82
<i>Tetraselmis sp.</i>	49,81	54,36	109,13

5.8.2 Refinación de biodiesel obtenido a partir de microalga

El primer experimento de refinación fue realizado con biodiesel vegetal de raps el cual fue llevado a cabo en dos experimentos de destilación. El porcentaje de FAME inicial como se

aprecia en la **Figura N°23** fue de 80,8%, cuyo valor aumentó a 94,7% desde el primer destilado que se recogió a los 140°C.

Figura N°23. Porcentaje ácidos grasos destilados en biodiesel raps.



Yong Wang *et al.* (2006) afirma que destilar FAME (biodiesel) es más fácil que destilar los ácidos grasos libres, ya que su punto de ebullición es relativamente bajo. Este autor comenzó a obtener destilado de microalgas desde los 180°C hasta los 240°.

La destilación de biodiesel de microalgas (con 10% de FAME) presenta ciertos inconvenientes en comparación con la refinación del biodiesel vegetal (de raps) ya que no fue fácil evitar aumentar demasiado la temperatura puesto que de lo contrario no había destilado. La primera fracción fue recién obtenida a los 180°C y según el análisis de ésta solo tenía un 0,21% de FAME por lo que correspondería a otra sustancia contenida en el biodiesel, aunque la neutralización del biodiesel sólo se llevó a cabo con agua y cloroformo. Incluso la segunda fracción contiene solo 0,09% de FAME y sigue siendo otra sustancia sin identificar. Ya en la fracción tres, la cual ascendía a 220°C dentro del sistema, los valores fueron más favorables con un 58,78% de FAME; por su parte la fracción cuatro contenía un 33,36% de FAME a una temperatura de 240°C.

6. CONCLUSIONES

- De acuerdo al contenido lipídico estudiado en las tres cepas de microalgas (*N. gaditana*, *P. tricornutum* y *Tetraselmis sp.*) la que presenta mejores resultados en cuanto a rendimiento es la cepa *N. gaditana*.
- El perfil lipídico de dos de las microalgas (*N. gaditana* y *P. tricornutum*) cumple con las expectativas y nuevamente *N. gaditana* es la que mejor características tiene de las tres.
- Los rendimientos de biodiesel son mejores en *N. gaditana* en cuanto a cantidad y calidad del mismo puesto que su composición muestra valores menores de ácidos grasos insaturados dentro de su composición.
- *Tetraselmis sp.* no evidencia características aceptables aun cuando su contenido de carotenoides y clorofilas fue casi nulo.
- Si bien las microalgas son versátiles y maleables gracias al método de cultivo usado, su genética evidencia que hay especies con mejores condiciones productoras de lípidos.
- La refinación del producto necesita de mayor evaluación del mismo, su inestabilidad provoca no obtener buenos resultados en su destilación.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abo-Shady A. M., Mohamed Y. A. and Lasheen T. (1993). Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biologia Plantarum* 35(4), 629-32, ISSN:1573-8264.
2. Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27: 1195–208.
3. Amin S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management* 50(7), 1834-40, ISSN: 0196-8904
4. Anita, N. G.; Cheng, J. Y. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *Br. Phycol. J.* 1982, 17, 39-50.
5. Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol* 2002;22:245–79.
6. Becker, E. W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1994.
7. Behrens PW, Kyle DJ. 1996. Microalgae as a source for fatty acids. *J Food Lipids* 3:259–272.
8. Blumreisinger M., Meindl D. and Loos E. (1983). Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry* 22(7), 1603-4, ISSN: 0031-9422.
9. Borowitzka MA. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: Cohen Z, editor. *Chemicals from microalgae*. Taylor & Francis; 1999. p. 313–52.
10. Brennan L. and Owende P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2), 557-77, ISSN: 1364-0321
11. Brown M. R. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids Sugars and pigments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161(1), 91-113, ISSN: 0022-0981.

12. Brown M. R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145(1), 79-99, ISSN: 0022-0981
13. Cañizares, R. O.; Molina, G.; Domínguez, A. R. Composición química de dos microalgas marinas utilizadas como alimento en maricultura. *Cryptogamie Algol.* 1994, 15, 121-133.
14. Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3), 294-306, ISSN: 0734-9750.
15. Chiu S-Y, Kao C-Y, Tsai M-T, Ong S-C, Chen C-H, Lin C-S. 2008. Lipid accumulation and CO₂ utilisation of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol* 100:833–838.
16. Domozych D. S., Stewart K. D. and Mattox K. R. (1980). The comparative aspects of cell wall chemistry in the green algae (Chlorophyta). *Journal of Molecular Evolution* 15(1), 1-12, ISSN: 1432-1432
17. Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1401–1426 (2004).
18. Ghirardi ML, Zhang JP, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, *et al.* Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnol* 2000;18:506–11.
19. Gressel J. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci* 2008; 174:246–63.
20. Gouveia L, Marques AE, Lopes da Silva T, Reis A. 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: A suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:821–826.
21. Griffiths MJ, Harrison STL. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21:493–507.
22. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 2008; 54:621–39
23. James, G.O., Hocart, C.H., Hillier, W., Chen, H., Kordbacheh, F., Price, G.D., Djordjevic, M.A. 2011. Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. *Bioresour. Technol.* 102, 3343-3351.

24. J. K.; Brown, M. R.; Dunston, G. A.; Jeffre, S. W. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 1993, 29, 69-78.
25. Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991;30: 555–73.
26. Kilian, O., Benemann, C.S., Niyogi, K.K., Vick, B. 2011. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis sp.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21265-21269.
27. Li, X., Benning, C., Kuo, M.H. 2012a. Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity. *Eukaryot. Cell* 11, 1451-1462.
28. Liu, B., Benning, C. 2013. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 300-309.
29. Loos E. and Meindl D. (1982). Composition of the cell wall of *Chlorella fusca*. *Planta* 156(3), 270-3, ISSN: 1432-2048
30. Lopez, D., Casero, D., Cokus, S.J., Merchant, S.S., Pellegrini, M. 2011. Algal Functional Annotation Tool: a web-based analysis suite to functionally interpret large gene lists using integrated annotation and expression data. *BMC Bioinformatics* 12, 282.
31. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalga as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 2003;18: 160–7.
32. Markovits, A.; López, L.; Costa, E.; Lutz, M. Microalgas como Alimento Humano Potencial (I). Evaluación Química y Biológica de *Phaeodactylum tricornutum*. *Aliment. Equip. Technol.* 1991, 87, 119-123.
33. Markley KS. Fatty acids—their chemistry, properties, production, and uses. New York: Interscience Publishing Inc.; 1960.
34. Melis A. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27: 1217–28.
35. Merchant, S.S., *et al.* 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-250.
36. Metting B, Pyne JW. Biologically-active compounds from microalgae. *Enzyme Microb Technol* 1986;8: 386–94.

37. Metzger P, Largeau C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 66:486–96.
38. M.R. Brown, M.A. McCausland, K. Kowalski, The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat, *Aquaculture* 165 (1998) 281–293.
39. Mutanda T., Ramesh D., Karthikeyan S., Kumari S., Anandraj A. and Bux F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102(1), 57-70, ISSN: 0960-8524
40. Northcote D. H., Goulding K. J. and Horne R. W. (1958). The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *The Biochemical journal* 70(3), 391-7, ISSN: 1470-8728.
41. Punnett T. and Derrenbacker E. C. (1966). The amino acid composition of algal cell walls. *Journal of General Microbiology* 44(1), 105-14, ISSN: 0022-1287
42. Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlege, R.E., Boore, J.L., Posewitz, M.C. 2012. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat. Commun.* 3, 686.
43. Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*; Blackwell Science Ltd.: Hudson County, NJ, USA, 2004. Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2010, 14, 217–232.
44. Roger Huerlimann, Rocky de Nys, Kirsten Heimann “Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production” (2010).
45. Sanchez Miron A, Ceron Garcia M-C, Contreras Gomez A, Garcia Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J* 2003;16: 287–97.
46. Schwartz RE. Pharmaceuticals from cultured algae. *J Ind Microbiol* 1990;5: 113–23.
47. Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21:277–86.

48. Shimizu Y. Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu Rev Microbiol* 1996;50: 431–65.
49. Shimizu Y. Microalgal metabolites. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 236–43.
50. S.P. Singh, Dipti Singh, Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. Madhya Pradesh, India (2010).
51. Singh S, Kate BN, Banerjee UC. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol* 2005; 25:73–95.
52. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 2006; 101: 87–96.
53. Stephens E., Ross I. L., King Z., Mussnug J. H., Kruse O., Posten C., Borowitzka M. A. and Hankamer B. (2010). An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature Biotechnology* 28(2), 126-8, ISSN: 1087-0156
54. Tyler, B. M. et al. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313, 1261–1266 (2006).
55. Vieler, A., Wu, G., Tsai, C.H., Bullard, B., Cornish, A.J., Harvey, C., Reza, I.B., Thornburg, C., Achawanantakun, R., Buehl, C.J., Campbell, M.S., Cavalier, D., Childs, K.L., Clark, T.J., Deshpande, R., Erickson, E., Armenia Ferguson, A., Handee, W., Kong, Q., Li, X., Liu, B., Lundback, S., Peng, C., Roston, R.L., Sanjaya, Simpson, J.P., Terbush, A., Warakanont, J., Zauner, S., Farre, E.M., Hegg, E.L., Jiang, N., Kuo, M.H., Lu, Y., Niyogi, K.K., Ohlrogge, J., Osteryoung, K.W., Shachar-Hill, Y., Sears, B.B., Sun, Y., Takahashi, H., Yandell, M., Shiu, S.H., Benning, C. 2012b. Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genet.* 8, e1003064.
56. Walter TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactor. *Plant Cell Rep* 2005;24: 629–41.
57. Wang B., Li Y., Wu N. and Lan C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(5), 707-18, ISSN: 1432-0614
58. Xu ZB, Yan XJ, Pei LQ, Luo QJ, Xu JL. 2008. Changes in fatty acids and sterols during batch growth of *Pavlova viridis* in photobioreactor. *J Appl Phycol* 20:237–243.

59. Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2012. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24, 3708-3724.
60. Zhukova NV, Aizdaicher NA. 1995. Fatty-acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39:351–356.
61. FAO, Oil production. FAO Corp Doc Repository. <www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm> [visitada 08.01.14].

8. ANEXOS I

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)			Ácidos Grasos Insaturados (%)						Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,47	14,42	0,31	2,82	7,53	23,57	1,93	1,30	3,00	15,20	40,16	55,36
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,42	12,39	0,26	7,08	6,58	21,24	1,57	1,06	2,72	13,08	40,25	53,33
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,91	11,28	0,21	3,44	3,85	17,60	1,43	0,38	4,53	12,39	31,22	43,62
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,35	11,97	0,24	6,13	3,90	19,38	1,60	0,46	2,89	12,55	34,36	46,92
PROMEDIO	0,54	12,52	0,25	4,87	5,46	20,45	1,63	0,80	3,29	13,31	36,50	49,81

Anexo N° 1. Perfiles ácidos grasos extracción Bligh and Dyer de *Tetraselmis sp.*, *P. tricornutum* y *N. gaditana*.

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)			Ácidos Grasos Insaturados (%)						Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>P. tricornutum</i>	4,89	8,83	0,17	14,27	2,38	3,59	0,39	0,05	22,00	13,89	42,67	56,56
<i>P. tricornutum</i>	3,46	6,11	0,10	10,02	1,70	2,69	0,27	0,00	15,34	9,66	30,02	39,68
<i>P. tricornutum</i>	6,21	13,22	0,33	15,10	4,22	8,07	1,23	0,21	21,58	19,77	50,41	70,18
<i>P. tricornutum</i>	4,88	7,96	0,17	10,58	2,52	3,44	0,72	0,13	17,57	13,01	34,95	47,96

PROMEDIO 4,86 9,03 0,19 12,49 2,70 4,45 0,65 0,10 19,12 14,08 39,51 53,59

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)				Ácidos Grasos Insaturados (%)					Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>N. gaditana</i>	5,86	16,75	0,27	17,64	1,65	10,89	0,11	2,24	12,67	22,88	45,20	68,08
<i>N. gaditana</i>	5,99	17,56	0,24	18,64	1,71	11,27	0,00	2,31	13,14	23,79	47,06	70,85
<i>N. gaditana</i>	5,91	14,44	0,29	14,88	2,81	4,32	0,14	2,16	13,23	20,64	37,54	58,18
<i>N. gaditana</i>	5,04	12,77	0,26	12,14	2,34	3,72	0,13	1,77	10,65	18,07	30,75	48,82
<i>N. gaditana</i>	4,69	14,24	0,28	17,50	1,57	6,40	0,16	2,20	12,06	19,21	39,90	59,10
<i>N. gaditana</i>	4,18	12,84	0,26	16,51	1,56	6,19	0,15	2,20	11,89	17,28	38,51	55,79
<i>N. gaditana</i>	3,54	8,19	0,20	12,04	1,94	3,17	0,11	2,87	15,41	11,94	35,55	47,49
<i>N. gaditana</i>	3,32	8,11	0,26	11,39	1,85	3,09	0,11	2,57	13,13	11,69	32,14	43,83
<i>N. gaditana</i>	4,93	13,17	0,18	13,66	1,54	8,74	0,00	2,17	11,95	18,27	38,06	56,33
<i>N. gaditana</i>	6,07	16,49	0,23	16,82	1,78	10,88	0,00	2,91	17,14	22,79	49,54	72,33
PROMEDIO	4,95	13,46	0,25	15,12	1,88	6,87	0,09	2,34	13,13	18,66	39,42	58,08

RESUMEN

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)				Ácidos Grasos Insaturados (%)					Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>Tetraselmis sp</i>	0,54	12,52	0,25	4,87	5,46	20,45	1,63	0,8	3,29	13,31	36,5	49,81
<i>P. tricorutum</i>	4,86	9,03	0,19	12,49	2,7	4,45	0,65	0,1	19,12	14,08	39,51	53,59

<i>N. gaditana</i>	4,95	13,46	0,25	15,12	1,88	6,87	0,09	2,34	13,13	18,66	39,42	58,08
--------------------	------	-------	------	-------	------	------	------	------	-------	--------------	--------------	--------------

Anexo N°2. Perfiles ácidos grasos extracción Soxhlet *Tetraselmis sp*, *P. tricornutum* y *N. gaditana*.

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)				Ácidos Grasos Insaturados (%)					Porcentajes totales		
	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Palmitoleico	Linoleico	Oleico	Eláidico	Araquidonico	Eicosano	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>Tetraselmis sp</i>	0,47	14,99	0,26	0,00	5,75	23,06	2,01	0,68	2,77	15,72	34,26	49,98
<i>Tetraselmis sp</i>	0,51	15,81	0,25	1,32	4,88	20,59	1,57	0,58	2,40	16,57	31,35	47,92
Promedio	0,49	15,40	0,26	0,66	5,31	21,83	1,79	0,63	2,59	16,15	32,81	48,95

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)				Ácidos Grasos Insaturados (%)					Porcentajes totales		
	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Palmitoleico	Linoleico	Oleico	Eláidico	Araquidonico	Eicosano	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>N. gaditana</i>	6,09	18,09	0,42	18,58	1,80	6,93	0,19	2,14	10,33	24,60	39,97	64,57
<i>N. gaditana</i>	6,01	17,68	0,43	18,45	1,78	6,77	0,19	2,14	10,54	24,12	39,86	63,98
Promedio	6,05	17,89	0,43	18,51	1,79	6,85	0,19	2,14	10,43	24,36	39,92	64,28

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)			Ácidos Grasos Insaturados (%)						Porcentajes totales		
	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Palmitoleico	Linoleico	Oleico	Eláidico	Araquidonico	Eicosano	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>P. tricornutum</i>	5,69	11,12	0,36	14,62	2,81	4,02	0,70	0,00	15,91	17,16	38,07	55,24
<i>P. tricornutum</i>	5,37	10,31	0,36	13,88	2,69	3,79	0,67	0,00	15,43	16,03	36,46	52,49
Promedio	5,53	10,71	0,36	14,25	2,75	3,91	0,69	0,00	15,67	16,60	37,26	53,86

CEPA	RESUMEN									Porcentajes totales		
	Ácidos Grasos Saturados				Ácidos Grasos Insaturados					% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3			
<i>N. gaditana</i>	6,05	17,89	0,43	18,51	1,79	6,85	0,19	2,14	10,43	24,36	39,92	64,28
<i>P. tricornutum</i>	5,53	10,71	0,36	14,25	2,75	3,91	0,69	0,00	15,67	16,60	37,26	53,86
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,49	15,40	0,26	0,66	5,31	21,83	1,79	0,63	2,59	16,15	32,81	48,95

Anexo N° 3. Perfiles ácidos grasos Biodiesel *Tetraselmis sp*, Biodiesel *P. tricornutum* y Biodiesel *N. gaditana*.

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)			Ácidos Grasos Insaturados (%)						Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>Tetraselmis sp</i>	0,41	14,45	0,48	7,60	6,00	24,59	1,76	0,75	3,37	15,34	44,06	59,40
<i>Tetraselmis sp</i>	0,39	12,56	0,42	7,67	5,21	21,37	1,53	0,65	2,93	13,36	39,36	52,72
<i>Tetraselmis sp</i>	0,36	12,16	0,33	7,31	5,13	20,71	1,50	0,64	2,83	12,85	38,12	50,97
PROMEDIO	0,39	13,06	0,41	7,53	5,45	22,22	1,59	0,68	3,04	13,85	40,51	54,36

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)			Ácidos Grasos Insaturados (%)						Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMEs totales
<i>P. tricornutum</i>	5,10	8,77	0,15	12,00	1,87	2,69	0,49	0,00	9,26	14,02	26,31	40,32
<i>P. tricornutum</i>	5,23	9,07	0,00	12,21	1,86	2,65	0,52	0,00	8,18	14,30	25,42	39,72
<i>P. tricornutum</i>	5,20	9,07	0,15	12,10	1,85	2,62	0,50	0,00	8,35	14,43	25,42	39,84
PROMEDIO	5,18	8,97	0,10	12,11	1,86	2,65	0,50	0,00	8,60	14,25	25,71	39,96

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)				Ácidos Grasos Insaturados (%)					Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMES totales
<i>N. gaditana</i>	5,06	15,14	0,20	15,85	1,57	5,66	0,14	4,07	10,38	20,40	37,67	58,06
<i>N. gaditana</i>	4,96	14,86	0,20	15,64	1,53	5,53	0,14	3,45	10,15	20,01	36,43	56,45
<i>N. gaditana</i>	4,80	14,36	0,19	14,94	1,48	5,34	0,12	1,86	9,39	19,35	33,12	52,48
PROMEDIO	4,94	14,79	0,20	15,47	1,53	5,51	0,13	3,12	9,97	19,92	35,74	55,66

6. RESUMEN

CEPA	Ácidos Grasos Saturados (%)				Ácidos Grasos Insaturados (%)					Porcentajes totales		
	C14:0	C16:0	C18h36o2	c16:1	C18:2n6c	C18:1n9c	C18:1n9c	C20:4n6	C20:5n3	% Ácidos Saturados	% Ácidos Insaturados	% FAMES totales
<i>Tetraselmis sp</i>	0,39	13,06	0,41	7,53	5,45	22,22	1,59	0,68	3,04	13,85	40,51	54,36
<i>P. tricornutum</i>	5,18	8,97	0,10	12,11	1,86	2,65	0,50	0,00	8,60	14,25	25,71	39,96
<i>N. gaditana</i>	4,94	14,79	0,20	15,47	1,53	5,51	0,13	3,12	9,97	19,92	35,74	55,66