

Producción de biodiésel por *Nannochloropsis* sp. bajo diferentes condiciones ambientales

Biodiesel production by Nannochloropsis sp. under different environmental conditions

Lic. Lidia Tadeo-Sánchez,^I MSc. Ingrid J. Puentes-Cárdenas,^I Dr. César M. Flores-Ortiz,^{II}
Dr. Didier Sánchez-García,^I MSc. Gabriela Pineda-Camacho,^I Dr. Eliseo Cristiani-Urbina^I

azul_0711@hotmail.com; puentes_johanna@hotmail.com; cmflores65@gmail.com;
didier_sanchez@hotmail.com; gabyinedacamacho@hotmail.com; ecristia@encb.ipn.mx

^IEscuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Colonia Casco de Santo Tomás, México; ^{II}Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México

● Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura, concentración de NaCl y fotoperiodo sobre la productividad de lípidos y el perfil de ácidos grasos del aceite de *Nannochloropsis* sp., el cual se utilizó como materia prima para la elaboración de biodiésel. Las mejores condiciones ambientales para el crecimiento celular y productividad de lípidos fueron: 0,025 g NaCl L⁻¹; 21 °C y 16:8 h luz:oscuridad. Los componentes mayoritarios del biodiésel obtenido a partir del aceite de *Nannochloropsis* sp. fueron el ácido palmítico, ácido oleico y ácido linoleico, los cuales proveen características deseables al biocombustible. Las propiedades del biodiésel obtenido en las condiciones antes mencionadas fueron: número de cetano 61; estabilidad oxidativa 11 h; viscosidad 2,71 mm² s⁻¹; densidad 887 kg m⁻³; punto de obstrucción del filtro en frío -9,46 °C, las cuales satisfacen lo establecido en las normas ASTM D6751 y EN 14214.

Palabras clave: *Nannochloropsis* sp., biodiésel, productividad de lípidos, ácidos grasos.

• Abstract

The aim of this paper was to evaluate the effect of temperature, NaCl concentration and photoperiod on lipids productivity and fatty acids profile of *Nannochloropsis* sp. oil, which was used as a feedstock for biodiesel production. The best environmental conditions for cell growth and lipids productivity were: 0,025 g NaCl L⁻¹, 21 °C and 16:8 h light/dark. The major components of biodiesel obtained from *Nannochloropsis* sp. oil were palmitic acid, oleic acid and linoleic acid, which provide desirable characteristics to the biofuel. The biodiesel properties obtained under the above conditions were: cetane number 61; oxidation stability 11 h; viscosity 2,71 mm² s⁻¹; density 887 kg m⁻³; and cold filter plugging point -9,46 °C, which satisfies the international standards ASTM D6751 and EN 14214.

Keywords: *Nannochloropsis* sp., biodiesel, lipids productivity, fatty acids.

• Introducción

El agotamiento de los combustibles fósiles, el incremento del precio del petróleo y sus derivados, la creciente demanda mundial de energía, los problemas progresivos de contaminación del aire, suelo y agua ocasionados por el uso extensivo de los combustibles fósiles, así como las preocupaciones por la salud y seguridad pública, han motivado la búsqueda de fuentes de energía renovables, sustentables y amigables con el ambiente /1/.

En la actualidad, los biocombustibles se consideran como una de las alternativas más prometedoras para reducir la dependencia mundial de los combustibles fósiles, reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, promover la generación de nuevas fuentes de empleo en las zonas rurales y aumentar la seguridad de abastecimiento energético /2/. Entre los posibles biocombustibles propuestos se destaca el biodiésel, porque podría ser suministrado de manera sostenible a partir de recursos renovables, y por sus diversas ventajas ambientales, económicas y sociales.

El biodiésel es una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga obtenidos por transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o

lípidos de microalgas /3/. Comparado con el diésel del petróleo, el biodiésel ofrece diversas ventajas, tales como: es un recurso energético renovable, biodegradable, produce menos emisiones tóxicas (monóxido de carbono, compuestos aromáticos, hidrocarburos, partículas en suspensión, óxidos de azufre y metales), es menos volátil, más seguro de transportar, almacenar y manipular, y aumenta el rendimiento, reduce el desgaste y extiende la vida útil de los motores, entre otras ventajas /1, 4, 5/.

Las microalgas son una fuente sustentable de lípidos que pueden ser utilizados como materia prima para la producción de biodiésel /6/ debido a su elevado contenido de lípidos, perfil idóneo de ácidos grasos para la obtención de biocombustible de calidad, alta productividad de lípidos referida a la unidad de área, facilidad de cultivo, elevada eficiencia fotosintética, capacidad para crecer en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, velocidad de crecimiento relativamente alta; además, las microalgas pueden proporcionar beneficios ambientales a través de la captura de CO₂ atmosférico, y con ello pueden contribuir a mitigar el cambio climático, entre otras /2, 7, 8/.

Se ha demostrado que el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos de las microalgas varía no solo entre especies e incluso entre cepas de microalgas, sino también en función de las condiciones de cultivo, del periodo de cosecha y de la edad del cultivo /1, 2, 5/. Entre los factores operacionales que afectan tanto el contenido de lípidos como el perfil de ácidos grasos de las microalgas se encuentran la temperatura, el fotoperiodo y la salinidad del medio de cultivo /9-11/. Basado en lo anterior, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de NaCl, temperatura y fotoperiodo sobre el crecimiento celular y producción de lípidos por *Nannochloropsis* sp., así como sobre las propiedades del biodiésel obtenido por transesterificación de los lípidos.

• Material y métodos

Microorganismo

La microalga utilizada en este trabajo fue *Nannochloropsis* sp., la cual fue proporcionada por el Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Medio de cultivo

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó el medio basal de Bold /12/. La microalga se conservó en viales y cajas Petri que contenían medio basal de Bold y 1,5 % (w/v) de agar bacteriológico.

Los inóculos se obtuvieron mediante la transferencia de colonias individuales de la microalga a matraces Erlenmeyer de 500 mL, que contenían 333 mL de medio de cultivo estéril de Bold. Los cultivos se mantuvieron con una aireación constante de 1 vvm, a 25 °C, con una intensidad luminosa de $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento se recolectaron las células mediante centrifugación a 3 000 rpm durante 10-15 min. El paquete celular se lavó dos veces con medio de cultivo estéril y a continuación se resuspendió en un pequeño volumen de medio de cultivo. Una muestra de esta suspensión celular se utilizó como inóculo en los experimentos realizados en el presente trabajo.

Condiciones de cultivo

Los experimentos para determinar el efecto de la concentración de NaCl, temperatura y del fotoperiodo sobre el crecimiento celular, consumo de nitrato, producción de lípidos y la composición de ácidos grasos de la microalga se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 333 mL de medio de cultivo. Se ensayaron cinco concentraciones de NaCl (0,005; 0,012 5; 0,025; 0,05 y 0,1 g L⁻¹), dos temperaturas (21 y 30 °C) y tres fotoperiodos (12 h de luz por 12 h de oscuridad, 16 h de luz por 8 h de oscuridad y 24 h de luz). Cada matraz se inoculó con un pequeño volumen de suspensión celular concentrada para obtener una concentración inicial de biomasa de aproximadamente 0,016 7 g L⁻¹. A los cultivos microalgales se les suministró aire estéril con un flujo de 1 vvm, y la temperatura e intensidad luminosa se mantuvieron a 25 °C y $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Se recolectaron muestras a diferentes tiempos de incubación, a las que se les determinó la concentración de biomasa y de nitrato residual. El contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos de la microalga se evaluaron al inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

Con los resultados obtenidos se estimó la velocidad específica máxima de crecimiento, tiempo de duplicación, productividad de biomasa y de lípidos, eficiencia global y velocidad volumétrica global de consumo de nitrato, así como las propiedades del biodiésel.

• Métodos analíticos

Concentración de biomasa

Se determinó por medio del peso seco de la masa celular. Para ello, las muestras se filtraron a través de membranas de fibra de vidrio (Whatman GF/A) de 1,6 μm . Posteriormente, las membranas se colocaron en una estufa a 90 °C, hasta alcanzar el peso constante. El peso de la biomasa se estimó por diferencia de pesos. Los filtrados obtenidos se utilizaron para determinar la concentración de nitrato residual.

Concentración de nitrato

La concentración de nitrato residual se determinó por medio del método de reducción de cadmio (NitraVer® 5), siguiendo los procedimientos descritos en el Hach Water Analysis Handbook /13/.

Determinación de la concentración de lípidos

La determinación de la concentración de lípidos se llevó a cabo gravimétricamente. Las células microalgales se separaron por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 min. Las células se lavaron dos veces con agua desionizada y a continuación se secaron por liofilización.

A continuación, una muestra de 30 mg de biomasa seca se mezcló con 15 mL de una solución de metanol-cloroformo (2:1, v/v) y se sonicó durante una hora. Luego, a la suspensión sonicada se le adicionaron 5 mL de cloroformo y 5 mL de una solución de NaCl al 1 % (w/v). La mezcla resultante se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min, y se recuperó la fase de cloroformo, la cual contenía los lípidos totales. Por último, el cloroformo se separó al vacío en un rotavapor rotatorio. El residuo se consideró como lípidos totales /14/.

Determinación de la composición de los ácidos grasos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se obtuvieron mediante el método descrito por O'Fallon *et al.* /15/ con ligeras modificaciones. A las muestras del aceite extraído (10 mg) se les adicionó 0,5 mL de trifluoruro de boro en metanol (12 %, w/v) y 100 μ L (0,1 mg) de ácido heptadecanoico como estándar interno. Se incubó en un baño de agua a 90 °C durante 20 min con agitación. Después de enfriar, se añadieron 0,5 mL de hexano y 1,0 mL de agua destilada, y se mezcló. A continuación, se centrifugó y la capa de hexano que contenía los FAME se colocó en viales de cromatografía de gases.

La separación y cuantificación de los FAME se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro de masas (Agilent Serie 5975C) acoplado a un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 Series II Network System). El cromatógrafo de gases está equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar (Agilent 19091S-433E, 30 m · 250 μ m · 0,25 μ m). La temperatura inicial del horno fue de 150 °C; se mantuvo durante 2 min, posteriormente se incrementó a 200 °C con una velocidad de 5 °C/min, y luego se elevó a 260 °C a una velocidad de 3 °C/min. La temperatura del inyector y del detector se mantuvo en 220 y 290 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas acarreador, con un flujo constante de 1,0 mL min⁻¹.

Estimación de las propiedades del biodiésel

La estimación de las propiedades del biodiésel obtenido en cada una de las condiciones experimentales se realizó con base en modelos matemáticos propuestos en la literatura (tabla 1).

• Resultados y discusión

Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento celular, consumo de nitrato y producción de lípidos

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. a las diferentes concentraciones de NaCl ensayadas. Se aprecia que las mayores concentraciones de biomasa se alcanzaron a concentraciones de NaCl de 0,025 y 0,05 g L⁻¹, con valores de 0,57 y

0,54 g L⁻¹, respectivamente. En contraste, la menor concentración de biomasa (0,24 g L⁻¹) se obtuvo a la menor (0,005 g L⁻¹) y mayor (0,1 g L⁻¹) concentración de NaCl ensayada.

Tabla 1. Modelos empleados para la determinación de las propiedades del biodiésel

Propiedad	Correlación	Referencia
Densidad a 15 °C (kg m ⁻³)	$\rho_B = \sum X_i \rho_i$ $\rho_i = 851,471 + \frac{250,718 db + 280,899 - 92,180 (m + 1)}{1,214 + n}$	/16/
Viscosidad cinemática a 40 °C (mm ² s ⁻¹)	$Lnv_B = \sum X_i Lnv_i$ $Lnv_{c-12:0-c20:0} = 2,177 - 0,202 n + \frac{403,66}{T} + \frac{109,77 n}{T}$ $Lnv_{c18:1} = -5,03 - \frac{2051,5}{T}$ $Lnv_{c18:2} = -4,51 - \frac{1822,5}{T}$ $CN_B = \sum X_i CN_i \quad Lnv_{c18:3} = -4,018 - \frac{1685,5}{T}$	/17/
Número de cetano	$CN_B = \sum X_i CN_i$ $CN_i = -21,157 + (7,965 - 1,785 db + 0,235 db^2)n - 0,099n^2$	/18/
Estabilidad oxidativa a 110 °C (h)	$\text{Estabilidad oxidativa} = \frac{117,925}{z} + 2,5905$	/19/
Punto de nube (CP) (°C)	CP= 0,526 (PAME) -4,992 0 < PAME < 45	/20/
Punto de fluidez (PP) (°C)	PP= 0,571 (PAME)-12,240 0 < PAME < 45	/20/
Punto de obstrucción del filtro en frío (CFPP) (°C)	CFPP= 8,924 3*LCSF (A)-19,325	/21/
Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)	$LCSF (A) = MP_{c18} * C18(\text{wt \%}) + MP_{c20} * C20(\text{wt \%})$ $HHV = 0,462 5v + 39,45$	/3/

db: número de dobles enlaces en la molécula del ácido graso; m: número de átomos de carbono en el alcohol usado para la transesterificación; n: número de átomos de carbono en el ácido graso original; T: temperatura absoluta (K); z: contenido de ácidos linoleico y linoléico (% w); PAME: contenido de metil éster del ácido palmítico; LCSF (A): factor de saturación de cadena larga, MP: punto de ebullición

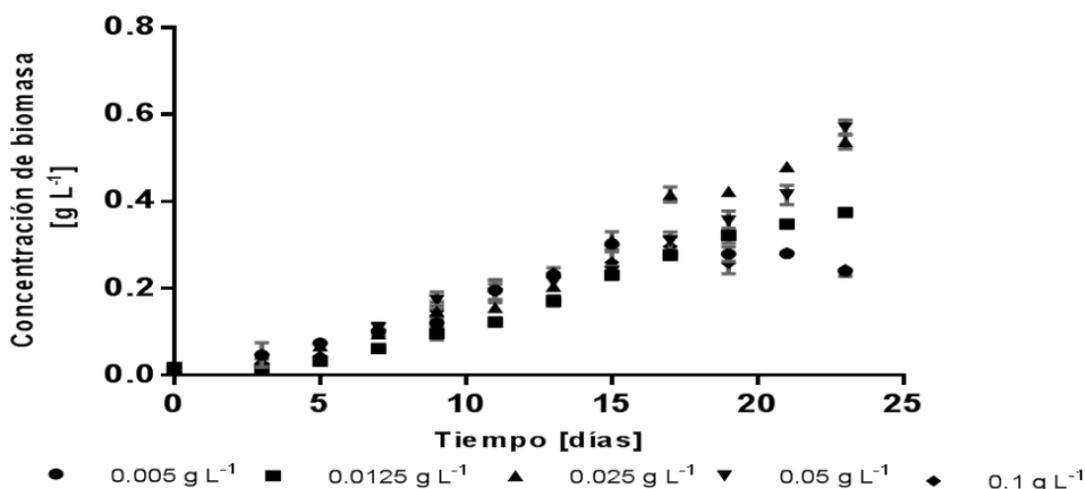


Fig. 1 Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

La velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de *Nannochloropsis* sp. fue afectada por la concentración de NaCl (tabla 2). Las velocidades específicas máximas de crecimiento más altas fueron de 0,142 y 0,15 d^{-1} y se obtuvieron a concentraciones de NaCl de 0,012 5 y 0,025 g L^{-1} , respectivamente. A concentraciones superiores de NaCl, la velocidad específica disminuyó de manera significativa, lo que ocasionó un incremento en el tiempo de duplicación de las células (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de crecimiento celular, consumo de nitrato y producción de lípidos por *Nannochloropsis* sp. a diferentes concentraciones de NaCl

Concentración de NaCl (g L^{-1})	0,005	0,012 5	0,025	0,05	0,1
$\mu_{\text{máx.}}$ (d^{-1})	0,125	0,142	0,150	0,076	0,09
Tiempo de duplicación (d)	5,51	4,88	4,62	9,08	6,89
Productividad máxima de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	0,019	0,016	0,023	0,024	0,017
Eficiencia de consumo de nitrato (%)	100	100	100	100	100
Velocidad de consumo de nitrato ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	16,67	16,67	16,67	14,70	14,70
Rendimiento lipídico (%)	41,00	30,70	30,72	21,0	37,06
Productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	3,93	4,77	6,95	5,05	2,71

La productividad máxima de biomasa también fue afectada por la concentración de NaCl, ya que los mayores valores de productividad ($0,023-0,024 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se encontraron a concentraciones de NaCl de $0,025$ y $0,05 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. A concentraciones superiores e inferiores de NaCl se observó una menor productividad de biomasa (tabla 2).

Se sabe que la acumulación de NaCl en los cloroplastos de plantas superiores o en el citoplasma de las células de cianobacterias provoca un estrés salino que afecta su tasa de crecimiento, lo que a menudo se asocia con la disminución de las actividades de transporte de electrones en la fotosíntesis /22/. Sobre la base de estos antecedentes, se puede relacionar el bajo crecimiento celular a una concentración alta de NaCl con el desequilibrio del metabolismo fotosintético, pues afecta directamente la eficiencia fotosintética de la microalga.

En la figura 2 se aprecia que la microalga fue capaz de consumir todo el nitrato presente en el medio de cultivo, por lo que la eficiencia global de consumo de la fuente de nitrógeno fue del 100 % (tabla 2) a todas las concentraciones de NaCl ensayadas. Sin embargo, el tiempo en el que se consumió totalmente la fuente de nitrógeno fue menor (15 días) y, en consecuencia, la velocidad volumétrica de su consumo fue mayor ($16,67 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) a las tres concentraciones más bajas de NaCl ($0,005$; $0,0125$ y $0,025 \text{ g L}^{-1}$).

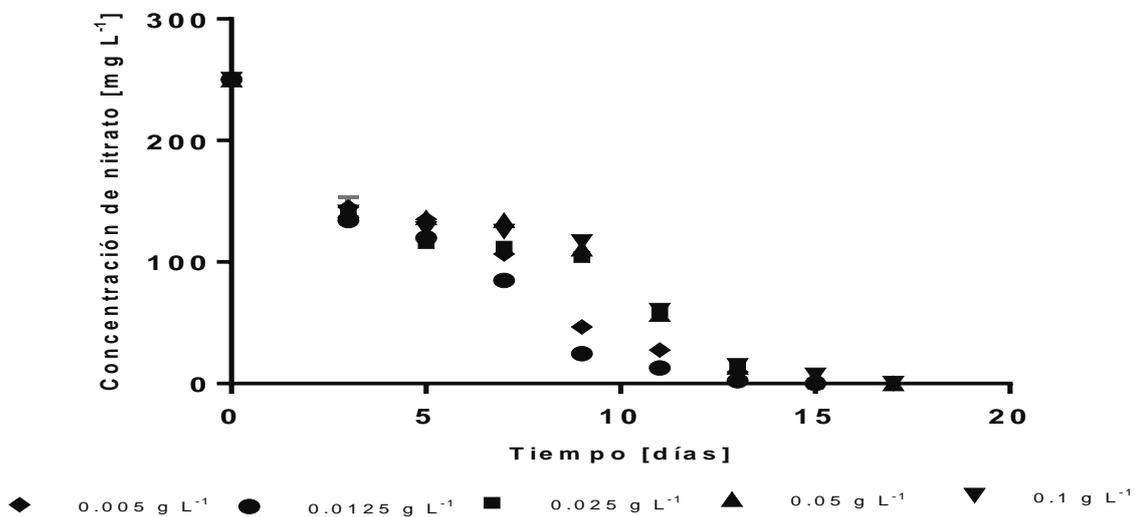


Fig. 2 Perfil de consumo de nitratos por *Nannochloropsis* sp. a diferentes concentraciones de NaCl

La productividad de lípidos más alta fue de $6,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y se obtuvo a una concentración de NaCl de $0,025 \text{ g L}^{-1}$, valor que corresponde al del medio de cultivo de Bold. Los menores valores de productividad de lípidos se alcanzaron a la concentración más baja ($0,005 \text{ g L}^{-1}$) y más alta ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) de NaCl ensayadas. Con base en lo anterior, los siguientes experimentos se realizaron utilizando una concentración de NaCl de $0,025 \text{ g L}^{-1}$.

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento celular, consumo de nitrato y producción de lípidos

Los perfiles de crecimiento celular de *Nannochloropsis* sp. a 21 y 30 °C se muestran en la figura 3.

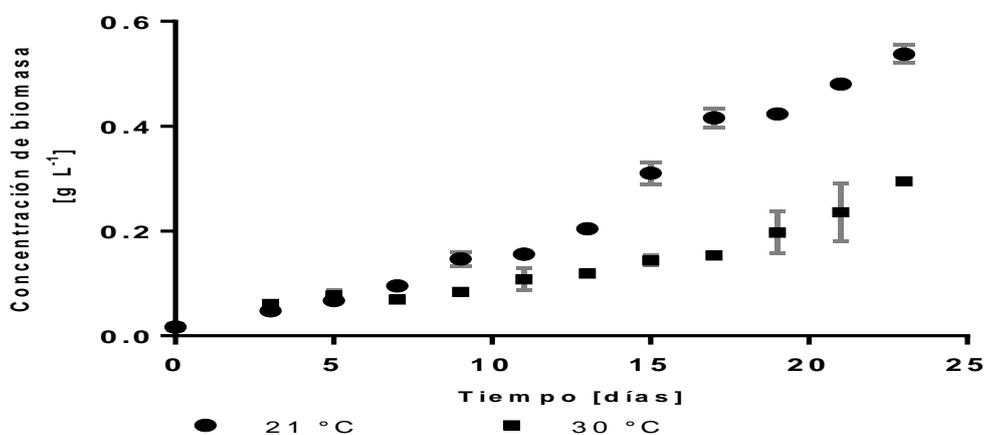


Fig. 3 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

Se evidencian diferencias notables en el crecimiento de la microalga a las temperaturas ensayadas. A una temperatura de 21 °C se alcanzó una concentración de biomasa final de $0,54 \text{ g L}^{-1}$, mientras que a 30 °C apenas se obtuvo $0,29 \text{ g L}^{-1}$ a los 23 días de incubación.

La velocidad específica máxima de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. fue mucho mayor a una temperatura de 21 °C en comparación con la obtenida a 30 °C y, en consecuencia, el tiempo de duplicación de la microalga a esta última temperatura fue aproximadamente 74,5 % superior con respecto a la de 21 °C. La productividad máxima de biomasa alcanzada a 21 °C fue 91,66 % superior a la obtenida a 30 °C (tabla 3).

Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado en la literatura para *Nannochloropsis oculata*, en donde el crecimiento celular de la microalga se favoreció a 20 °C /11/.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento celular, consumo de nitrato y producción de lípidos por *Nannochloropsis* sp. a distintas temperaturas

Temperatura (°C)	21	30
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,150	0,086
Tiempo de duplicación (d)	4,62	8,06
Productividad máxima de biomasa (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0,023	0,012
Eficiencia de consumo de nitrato (%)	100	100
Velocidad de consumo de nitrato (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	16,67	11,90
Rendimiento lipídico (%)	30,72	31,75
Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	6,95	3,83

El nitrato se agotó a los 15 días de incubación cuando la microalga se cultivó a 21 °C; en contraste, se requirieron 23 días de cultivo para que se consumiera totalmente la fuente de nitrógeno a la temperatura de 30 °C (figura 4).

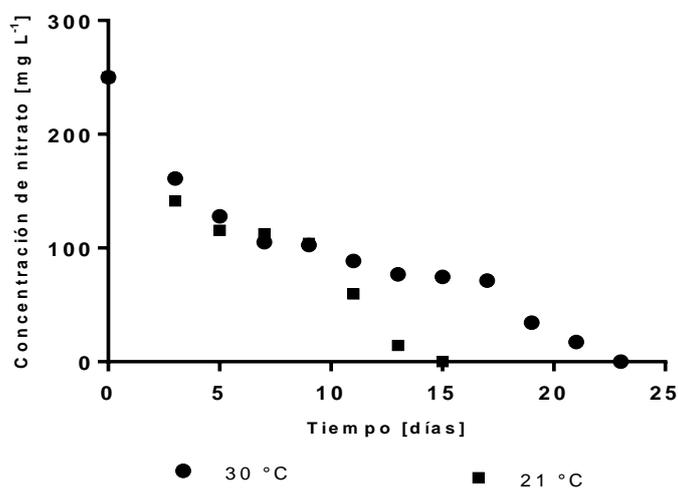


Fig. 4 Efecto de la temperatura sobre el consumo de nitrato por *Nannochloropsis* sp.

Aun cuando la eficiencia global de consumo de nitrato fue del 100 % a las dos temperaturas ensayadas, la velocidad volumétrica de consumo alcanzada a 21 °C fue significativamente superior a la lograda a 30 °C (tabla 3).

La temperatura de crecimiento también afecta la composición bioquímica de las células. Para el caso de microalgas como *Nannochloropsis*, *Chlorella* o *Scenedesmus*, se ha encontrado que temperaturas entre 20 y 25 °C son óptimas para la producción de lípidos, mientras que temperaturas superiores reducen sensiblemente la cantidad de lípidos producidos /23/.

Es de notarse que a las dos temperaturas ensayadas en el presente trabajo, el contenido de lípidos de *Nannochloropsis* sp. fue semejante (30,72-31,75 %); sin embargo, la productividad de lípidos fue mucho mayor a la temperatura de 21 °C (6,95 mg L⁻¹ d⁻¹); ello se debió a que la productividad de biomasa a dicha temperatura fue mayor que a 30 °C.

Es conveniente mencionar que la productividad de lípidos está directamente relacionada con la productividad de biomasa y con el rendimiento de lípidos /1/. El análisis de varianza de una vía corroboró que existe diferencia significativa entre las productividades de lípidos obtenidas a 21 y 30 °C (P < 0,05). Sobre la base de estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron a 21 °C.

Los resultados anteriores coinciden con lo encontrado en algunas microalgas dulceacuícolas, tal como *Scenedesmus* sp. LX1, la cual exhibe mayor productividad de lípidos a 20 °C /23/.

Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento celular, consumo de nitrato y producción de lípidos

La variación de la concentración de biomasa de *Nannochloropsis* sp. con respecto al tiempo de incubación a los tres fotoperiodos evaluados se muestra en la figura 5.

Se encontró que la concentración de biomasa aumentó con el número de horas de exposición a la luz. Cuando la microalga se expuso continuamente a la luz (24 h), se alcanzó la mayor concentración de biomasa al final del experimento, con un valor de 0,96 g L⁻¹, mientras que se

obtuvieron 0,54 y 0,07 g de biomasa L⁻¹ cuando se aplicaron 16 y 12 h de luz, respectivamente.

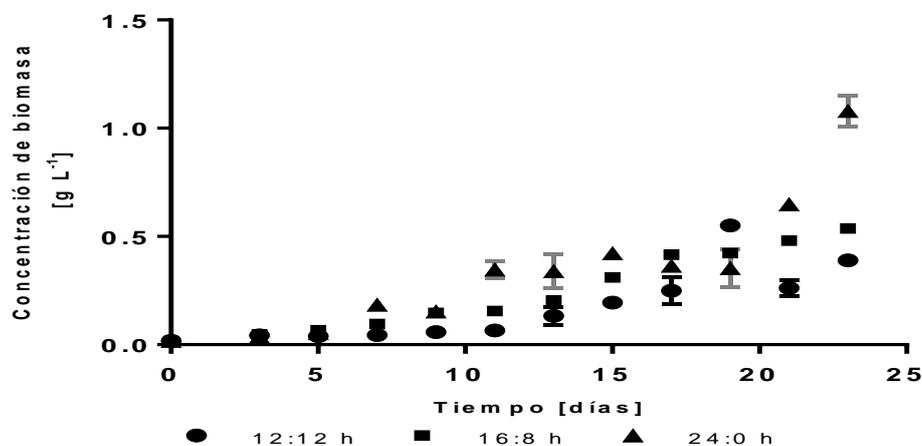


Fig. 5 Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

En consecuencia, la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad máxima de biomasa aumentaron y el tiempo de duplicación de la microalga disminuyó con el incremento en el número de horas de exposición a la luz (tabla 4). Estos resultados indican que los cultivos de *Nannochloropsis* sp. estuvieron limitados por luz cuando se utilizaron fotoperiodos de 16 h de luz y 8 de oscuridad, y de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento celular, consumo de nitrato y producción de lípidos por *Nannochloropsis* sp. a diferentes fotoperiodos

Fotoperiodo (Horas luz:oscuridad)	12:12	16:8	24:0
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,087	0,150	0,230
Tiempo de duplicación (d)	7,97	4,62	3,00
Productividad máxima de biomasa (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0,006	0,023	0,041
Eficiencia de consumo de nitrato (%)	97,31	100	97,95
Velocidad de consumo de nitrato (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	10,57	11,90	10,64
Rendimiento lipídico (%)	11,00	30,72	15,99
Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	0,27	6,95	6,54

En los primeros ocho días de incubación, la velocidad de consumo de nitrato se incrementó con el aumento en el número de horas luz (figura 6); sin embargo, la eficiencia global y la velocidad volumétrica global de consumo de nitrato fueron ligeramente superiores en el fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 h de oscuridad (tabla 4).

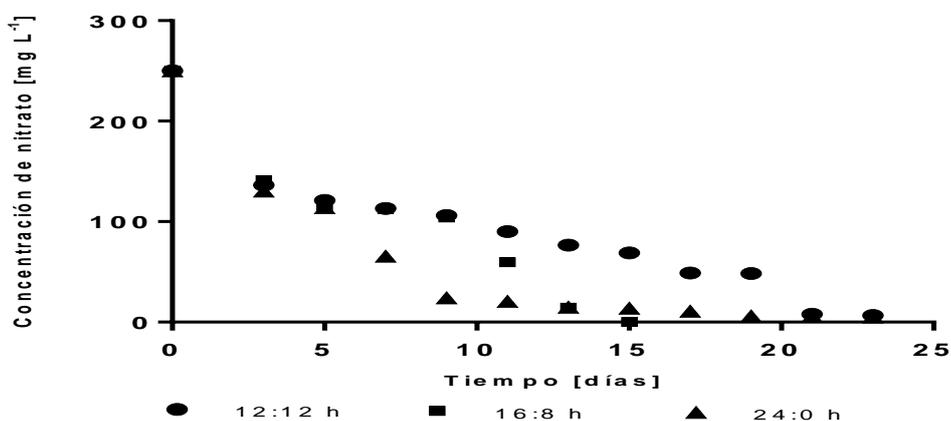


Fig. 6 Efecto del fotoperiodo sobre el consumo de nitrato por *Nannochloropsis* sp.

El mayor rendimiento y productividad de lípidos de *Nannochloropsis* sp. se encontró a un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Aun cuando *Nannochloropsis* sp. acumuló menor cantidad de lípidos al cultivarse con un fotoperiodo de 24 h de luz que con 16 h de luz y 8 h de oscuridad (tabla 4), la productividad de lípidos alcanzada en ambos fotoperiodos fue similar; esto se debe a que en el fotoperiodo de 24 h de luz se obtuvo la mayor productividad de biomasa.

Los resultados anteriores muestran claramente que el crecimiento celular y la producción de lípidos por *Nannochloropsis* sp. dependen de la salinidad (NaCl) del medio de cultivo, temperatura y fotoperiodo que se utilicen durante el cultivo de la microalga.

Efecto de la concentración de NaCl, temperatura y fotoperiodo sobre la composición de ácidos grasos de *Nannochloropsis* sp.

En la tabla 5 se muestran los ácidos grasos detectados en los lípidos extraídos de la microalga una vez que se llevó a cabo la reacción de transesterificación.

A todas las concentraciones de NaCl ensayadas, el ácido palmítico y oleico estuvieron presentes en los lípidos de la microalga (tabla 5).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de *Nannochloropsis* sp. a las diferentes condiciones ambientales evaluadas

Ácido graso (%)		Experimentos							
		1a	2a	3a	4a	*Control	1b	1c	2c
Ácido mirístico	C14:0	0,71	0,72	ND	0,11	0,17	0,25	ND	ND
Ácido palmítico	C16:0	29,72	28,69	25,05	20,10	30,31	43,88	25,86	51,37
Ácido 7-palmitoleico	C16:1	ND	ND	7,86	7,57	ND	ND	5,57	3,32
Ácido palmitoleico	C16:1	ND	ND	3,81	2,29	1,21	ND	1,13	ND
Ácido 7,10-hexadecadienoico	C16:2	2,29	2,58	2,43	2,11	3,62	1,03	3,03	1,31
Ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	C16:3	6,31	5,73	ND	ND	8,46	ND	ND	ND
Ácido 4,7,10,13-hexadecatetraenoico	C16:4	ND	ND	ND	19,69	ND	ND	ND	ND
Ácido esteárico	C18:0	6,48	8,38	1,28	1,06	1,60	6,63	0,76	3,88
Ácido oleico	C18:1	21,11	20,58	0,3	0,15	25,57	28,13	41,60	30,74
Ácido vaccénico	C18:1	ND	ND	ND	ND	ND	5,49	ND	ND
Ácido linoleico	C18:2	10,84	11,53	14,41	15,80	14,71	8,07	14,81	7,65
Ácido linoléico	C18:3	13,50	11,94	25,71	27,08	ND	ND	ND	ND
Ácido araquidónico	C20:4	7,77	1,33	19,44	4,04	1,28	ND	0,86	ND
Ácido behénico	C22:0	ND	ND	ND	ND	ND	3,53	ND	ND
Ácido docosahexanoico	C22:6	ND	6,97	ND	ND	11,84	2,99	6,39	1,73
Ácido lignocérico	C24:0	0,74	0,66	ND	ND	1,25	ND	ND	ND
Ácido nervónico	C24:1	ND	0,39	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido cerótico	C26:0	0,54	0,50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácidos grasos saturados		38,19	38,96	26,34	21,27	33,32	54,30	26,62	55,25
Ácidos grasos monoinsaturados		21,11	20,97	11,67	10,00	26,77	33,62	48,30	34,06
Ácidos grasos polinsaturados		40,71	40,07	62,00	68,72	39,91	12,09	25,08	10,69

a: Efecto de la concentración de NaCl [g L⁻¹]; 1:0,005; 2:0,012 5; 3:0,05; 4:0,1; b: Efecto de la temperatura (°C); 1:30; c: Efecto del fotoperiodo (h); 1: 12:12 , 2: 24:0. *Control: 0,025 g L⁻¹ NaCl, 21 °C y 16:8 h. ND: No detectado.

El ácido oleico es el principal componente del biodiésel y es un importante indicador de la calidad del mismo. Se ha informado que los aceites ricos en ácido oleico son adecuados para la elaboración de combustibles, ya que se obtiene una adecuada estabilidad oxidativa, lubricidad, calor de combustión, calidad de ignición y una baja viscosidad. Debido a lo anterior, es deseable que la productividad de ácido oleico sea alta. Asimismo, el ácido palmítico, al ser un ácido graso saturado de cadena larga, le imparte al biodiésel mayor número de cetano y, por lo tanto, mayor estabilidad oxidativa.

Se observó que, en general, la concentración de NaCl no influyó considerablemente en el tipo de ácidos grasos presentes en los lípidos, pero sí en la concentración de los mismos. La concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados se incrementó a bajas concentraciones de NaCl (0,005 y 0,012 5 g L⁻¹) y la de ácidos grasos polinsaturados aumentó a altas concentraciones de la sal (0,05 y 0,1 g L⁻¹). Altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados no son convenientes para la elaboración de biodiésel porque afectan de manera negativa su estabilidad oxidativa.

Se ha reportado que la composición de ácidos grasos de *Dunaliella* es afectada por la salinidad del medio de cultivo. Con esta microalga se encontró que el incremento de la concentración de NaCl de 0,4 a 4 M provocó un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y un decremento en el de ácidos grasos polinsaturados /24/.

En el presente trabajo se encontró que a una concentración de NaCl de 0,025 g L⁻¹, correspondiente a la del medio basal de Bold (control), se tiene un balance adecuado de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, así como un contenido apropiado de ácido palmítico y oleico.

Respecto al efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de *Nannochloropsis* sp. se encontró que se incrementó significativamente el contenido de ácidos grasos saturados y en menor proporción el de ácidos grasos monoinsaturados cuando la microalga se cultivó a 30 °C. Aun cuando es deseable que el biodiésel contenga ácidos grasos saturados y monoinsaturados, puesto que le confieren estabilidad oxidativa y un número de

cetano alto, una alta concentración de ácidos grasos saturados compromete las propiedades de flujo del biodiésel a bajas temperaturas /25/. En base a lo anterior, una temperatura de 30 °C no es conveniente para la producción de biodiésel a partir del aceite de *Nannochloropsis* sp. En la tabla 5 también se muestra la composición de ácidos grasos obtenida para los fotoperiodos ensayados. Se evidencia que en el cultivo expuesto a un mayor tiempo de iluminación se sintetizó mayor cantidad de ácidos grasos saturados, con un valor de aproximadamente 55,25 %, porcentaje que en su mayoría se debe al ácido palmítico. En contraste, el cultivo expuesto a menor tiempo de iluminación presentó un menor contenido de ácidos grasos saturados, pero mayores niveles de ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico. Estos resultados son congruentes con el hecho de que en la fase oscura de la fotosíntesis es donde se favorece la síntesis de ácidos grasos insaturados /26/. Aun cuando en el fotoperiodo de 24 h de luz se alcanzó una alta concentración y productividad de biomasa, así como una alta productividad de lípidos, el contenido de ácidos grasos saturados es muy alto. Asimismo, resulta conveniente tomar en cuenta que las microalgas son organismos fotosintéticos que requieren de periodos de luz y oscuridad para que sus actividades metabólicas ocurran en forma sincronizada y adecuada durante largos periodos. Desde el punto de vista de viabilidad económica y financiera también es conveniente operar los fotobiorreactores con periodos de luz y oscuridad, ya que los costos de iluminación impactan negativamente en la economía del proceso de producción.

Teniendo en cuenta el perfil de ácidos grasos (balance aceptable de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, así como un contenido conveniente de ácido oleico y palmítico) y la productividad de lípidos, el fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad resulta más ventajoso para la producción de biodiésel a partir de los lípidos de *Nannochloropsis* sp.

Estimación de algunas propiedades del biodiésel

Se sabe que las propiedades importantes del biodiésel, tales como la densidad, viscosidad, número de cetano, estabilidad oxidativa, propiedades de flujo en frío, calor de combustión, entre otras, dependen directamente de la composición de los ácidos grasos que se encuentran en el aceite microalgal. Para la obtención de biodiésel de buena calidad es necesario verificar que el aceite utilizado como materia prima contenga ácidos grasos de cadena larga con un

bajo grado de insaturación (preferentemente ácidos palmítico, oleico y mirístico), que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible sin comprometer sus características de flujo, viscosidad y lubricidad. En cuanto a los ácidos grasos polinsaturados, la norma europea EN 14214 limita el contenido de ácido linolénico y de los ácidos grasos con cuatro enlaces dobles o más a 12 % y 1 %, respectivamente /27/.

En la tabla 6 se muestran las principales propiedades de los biodiésel obtenidos a partir de los lípidos de *Nannochloropsis* sp., y se comparan con lo establecido por la *European Union Standards* EN 14214 y la *American Standards for Testing Materials* ASTM 6751.

Se aprecia que, en general, el biodiésel obtenido bajo todas las condiciones ambientales ensayadas cumple con las especificaciones de alguna de las normas establecidas.

Tabla 6. Propiedades de los biodiésel obtenidos a partir de los lípidos de *Nannochloropsis* sp.

Propiedad	Experimentos								EN 14214:2008	ASTM D 6751
	1a	2a	3a	4a	*Control	1b	1c	2c		
Densidad a 15 °C (kg m ⁻³)	885	885	892	897	887	875	882	875	860-900	ND
Viscosidad cinemática a 40 °C (mm ² s ⁻¹)	3,19	3,19	2,55	2,46	2,71	3,68	3,05	3,75	3,50-5,00	1,9-6,0
Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)	41	41	41	41	41	41	41	41	35	ND
Número de cetano	59	61	49	46	61	72	63	71	Min. 51	Min. 47
Estabilidad oxidativa a 110 °C (h)	7	8	6	5	11	17	11	18	Min. 6	Min. 3
Punto de nube (°C)	10,64	10,10	8,18	5,58	10,95	18,09	8,61	22,03	Específico por país	**
Punto de fluidez (°C)	4,73	4,14	2,06	-0,76	5,07	12,82	2,52	17,09	ND	ND
Punto de obstrucción del filtro en frío (°C)	20,64	32,35	-11,43	-12,79	-9,46	21,57	-14,63	4,57	Variable	ND
Porcentaje de ácido linolénico	13,50	11,94	25,71	27,08	-	-	-	-	Max. 12	ND

a: Efecto de la concentración de NaCl [g L⁻¹]; 1: 0,005, 2: 0,012 5, 3: 0,05, 4: 0,1; b: Efecto de la temperatura (°C); 1:30; c: Efecto del fotoperiodo (h); 1: 12:12 , 2: 24:0, *Control: 0,025 g L⁻¹ NaCl, 21 °C y 16:8 h. ** Las propiedades a bajas temperaturas no se especifican, deben ser acordadas entre el proveedor del combustible y el comprador, ND: no determinado.

Cuando se utilizó una temperatura de 30 °C y un fotoperiodo de 24:0 h, la densidad fue menor que la que presentó el control, caso contrario en los valores de viscosidad cinemática, pues los obtenidos a las condiciones mencionadas fueron mayores que las del control; esto podría ser debido a un mayor contenido de ácidos grasos saturados /3/. El poder calorífico del biodiésel obtenido en todas las condiciones ambientales ensayadas fue de 41 MJ kg⁻¹, el cual es superior al valor mínimo sugerido por la norma EN 14214.

El número de cetano de los biodiésel obtenidos en la mayoría de las condiciones ambientales cumple con lo establecido en las normas europea y americana, con excepción de los producidos cuando se utilizaron las concentraciones más altas de NaCl, lo cual podría deberse a la mayor proporción de ácidos grasos polinsaturados de los aceites obtenidos en estas condiciones.

Asimismo, el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados de los aceites obtenidos a las concentraciones más altas de NaCl también repercutió de forma adversa en la estabilidad oxidativa de los biodiésel producidos en dichas condiciones, por lo que se consideran más susceptibles a oxidarse durante el almacenamiento.

Los mayores valores de estabilidad oxidativa se obtuvieron con los biodiésel obtenidos a 21 °C y 0,025 g NaCl L⁻¹ (experimento control), a 30 °C, en el fotoperiodo de 24 h de luz; ello se debe al contenido bajo de ácidos grasos polinsaturados de los lípidos.

Por otra parte, los límites de las propiedades de flujo a bajas temperaturas (punto de nube, punto de fluidez y punto de obstrucción del filtro en frío) no están establecidos en las normas, debido a que dependen de la temporada estacional y ubicación geográfica del país donde se produzca y utilice el biodiésel. Por ejemplo, en España el punto de obstrucción del filtro en frío es aceptado como 0 °C en verano y -10 °C en invierno /27/. En las condiciones ambientales ensayadas en el presente trabajo, los biodiésel que entran en las especificaciones para España son los obtenidos en el fotoperiodo de 12:12 h y a las concentraciones más altas de NaCl, además del control, en las que se obtuvo un valor negativo para el punto de obstrucción del filtro en frío, el cual representa la temperatura más baja en la que un combustible tendrá problemas para la libre circulación en el motor. Esto es importante, ya que

en los países de clima templado frío un punto de obstrucción del filtro en frío alto causa una obstrucción de los motores de los vehículos con mayor facilidad.

Por último, la norma europea establece que el límite máximo de ácido linolénico debe ser menor a 12 %. Las únicas condiciones ambientales en las que los biodiésel no cumplen con este criterio es a concentraciones de NaCl mayores que el experimento control (> 12 %).

Lo anterior muestra que las propiedades del biodiésel producido a partir de los lípidos de *Nannochloropsis* sp. cumplen, en general, con las especificaciones internacionales. Sin embargo, las condiciones ambientales de cultivo de la microalga en las que se obtiene un balance adecuado entre el crecimiento de la microalga, productividad de lípidos y calidad adecuada del biodiésel es a una concentración de NaCl de 0,025 g L⁻¹, 21 °C y 16:8 h.

• Conclusiones

Las condiciones ambientales adecuadas para obtener un balance adecuado entre productividad de biomasa, productividad de lípidos y perfil de ácidos grasos para la elaboración de biodiésel a partir de *Nannochloropsis* sp. son: concentración de NaCl de 0,025 g L⁻¹, temperatura de 21 °C y un fotoperiodo de 16:8 h. Con estas condiciones se tienen las propiedades de biodiésel que cumplen con los límites establecidos por los estándares internacionales ASTM D 6751 y EN 14214.

Además, el perfil de ácidos grasos de *Nannochloropsis* sp. exhibe un alto contenido de ácidos palmítico y oleico, lo cual es un indicador del potencial de esta microalga para la elaboración de un biocombustible de alta calidad.

• Bibliografía

1. SÁNCHEZ GARCÍA, D., et al. "Effect of nitrate on lipid production by *T. suecica*, *M. contortum* and *C. minutissima*". *Cent, Eur, J, Biol.* 2013, 8, 6, p. 578-590.
2. MATA, T.; MARTINS, A.; CAETANO, N. "Microalgae for biodiesel productions and other applications: a Review". *Renew, Sustain, Energ, Rev.* 2010, 14, p. 217-232.

3. DEMIRBAS, A. "Relationships derived from physical properties of vegetable oil and biodiesel fuels". *Fuel*. 2008, 87, p. 1743-1748.
4. HUANG, G. H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, G. "Biodiesel production by microalgal biotechnology". *Appl, Energ*. 2010, 87, 1, p. 38-46.
5. WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, Y. H. "Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*". *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2009, 40, p. 13-20.
6. SMITH, V. H.; BELINDA, S. M.; STURM, F.; DE NOYELLES, J.; SHARON, A. B. "The ecology of algal biodiesel production". *Trends Ecol. Evol.* 2009, 25, 5, p. 301-309.
7. CHAICHALERM, S.; POKETHITIYOOK, P.; YUAN, W.; MEETAM, M.; SRITONG, K., et al. "Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media". *Appl. Energ.* 2012, 89, p. 296-302.
8. CHISTI, Y. "Biodiesel from microalgae beats bioethanol". *Trends Biotechnol.* 2007, 26, 3, p. 126-131.
9. RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N., et al. "Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor". *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102, p. 100-112.
10. RAGHAVAN, G.; HARIDEVI, C. K.; GOPINATHAN, C. P. "Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels". *Aquac. Res.* 2008, 39, p. 1053-1058.
11. CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, Y. E.; PEREGO, P.; BORGHI, M. "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production". *Chem. Eng. Process.* 2009, 48, 6, p. 1146-1151.
12. SCRAGG, A. H.; MORRISON, J.; SHALES, S. W. "The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine". *Enzyme Microb. Technol.* 2003, 33, p. 884-889.
13. HACH COMPANY. "Hach water analysis handbook". 5th edition. USA: 2008.

14. CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; TSAI, M. T.; ONG, S. C.; CHEN, C. H.; LIN, C. S. "Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration". *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 2, p. 833-838.
15. O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. "A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils and feedstuffs". *J. Anim. Sci.* 2007, 85, p. 1511-1521.
16. LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, J.; ARMAS, O. "Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed biodiesel cetane". *Chem. Phys. Lipids.* 2010, 163, p. 720-727.
17. KRISNANGKURA, K.; YIMSUWAN, T.; PAIRINTRA, R. "An empirical approach in predicting biodiesel viscosity at various temperatures". *Fuel.* 2006, 85, p. 107-113.
18. LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, J.; FONT DE MORA, E. "Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number". *Energ. Policy.* 2009, 37, p. 4337-4344.
19. PARK, J. Y.; KIM, D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C.; KIM, Y. J.; LEE, J. S. "Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties". *Bioresour. Technol.* 2008, 99, p. 1196-1203.
20. SARIN, A.; ARORA, R.; SINGH, N. P.; SARIN, R.; MALHOTRA, R. K.; KUNDU, K. "Effect of blends of Palm–*Jatropha*–*Pongamia* biodiesels on cloud point and pour point". *Energ.* 2009, 34, p. 2016-2021.
21. RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. "Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties". *Bioresour. Technol.* 2009, 100, p. 261-268.
22. SUDHIR, P.; MURTHY, S. D. S. "Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis". *Photosynthetica.* 2004, 42, 4, p. 481-486.
23. XIN, L.; HONG YING, H.; YU PING, Z. "Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp, under different cultivation temperature". *Bioresour Technol.* 2011, 102, 3, p. 3098-3102.
24. TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. "Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells". *J. Biosci. Bioeng.* 2006, 101, 3, p. 223-226.

25. HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. "Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances". *Plant J.* 2008, 54, p. 621-639.
26. DE BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. "Microalgae growth-promoting bacteria as «helpers» for microalgae: A novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater". *Water Res.* 2004, 38, p. 466-474.
27. ARIAS PEÑARANDA, M. T.; CRISTIANI URBINA, E.; MONTES HORCASITAS, C.; ESPARZA GARCÍA, F.; TORZILLO, G.; CAÑIZARES VILLANUEVA, R. O. "Scenedesmus incrassatulus CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production". *Bioresour. Technol.* 2013, 140, p. 158-164.