

Cómo citar este artículo:

Robles Heredia, J. C., Narváez García, A., & Ruiz Marín, A. (2022). Obtención de ácidos grasos de metil esterres en biomasa algal a diferentes tasas de aireación en FBR de columna. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 69-82.

OBTENCIÓN DE ACIDOS GRASOS DE METIL ESTERRES EN BIOMASA ALGAL A DIFERENTES TASAS DE AIREACION EN FBR DE COLUMNA

Juan Carlos Robles Heredia

Universidad Autónoma del Carmen (México)

jrobles@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0003-2591-6528>

Asteria Narváez García

Universidad Autónoma del Carmen (México)

anarvaez@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0001-6484-6062>

Alejandro Ruiz Marín

Universidad Internacional Iberoamericana (México)

aruiz@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0001-5075-9611>

Resumen. Los combustibles fósiles contribuyen en la contaminación del aire, por los compuestos que se liberan a la atmosfera durante la combustión; por esta razón se han propuesto reemplazarlos por los llamados biocombustibles, como el biodiesel que es la mezcla de esterres metílicos de ácidos grasos (FAME) por sus siglas en inglés, que puede sustituir al diésel y se obtiene de diferentes materias primas, como la biomasa. Se analizó la variación de crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos y calidad del biodiesel en función del tipo de FAME de *Chlorella vulgaris* por efecto de la hidrodinámica en fotobiorreactores de columna (FBRC), variando flujos de aireación a (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y luz blanca continua; además de la tasa de corte para comprobar probable presencia de estrés hidrodinámico. Los datos en tasa de corte fueron bajos (26.34 a 45.60) s⁻¹, mientras que los máximos valores de crecimiento celular y tasa de crecimiento específico (μ) fueron de (6.80 x 10⁶ cel mL⁻¹ y 0.023 d⁻¹), respectivamente; por otra parte, el consumo de nitrógeno fue de 65% a 0.75 vvm y productividad de lípidos de 15.92 mgL⁻¹d⁻¹ a 1.25 vvm. En relación a los FAME, se observó mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm; mientras que a 1.25 vvm, fueron saturados (SFA); la mayor cantidad de monoinsaturados (MUFA) fue a 0.75 vvm. Los componentes con mayor presencia fueron C12:0; C20:5N3; C24:1; C 22:0; C22:2.

Palabras clave: FAME, aireación, *Chlorella vulgaris* fotobiorreactor, hidrodinámica

OBTAINING FATTY ACIDS OF METHYL ESTERS IN ALGAL BIOMASS AT DIFFERENT AERATION RATES IN COLUMN FBR

Abstract. Fossil fuels contribute to air pollution, due to the compounds that are released into the atmosphere during combustion; For this reason, they have been proposed to replace them with so-called biofuels, such as biodiesel, which is the mixture of fatty acid methyl esters (FAME) for its acronym in English, which can replace diesel and is obtained from different raw materials, such as biomass. . The variation of cell growth, nitrogen consumption, lipid productivity and biodiesel quality was analyzed depending on the type of FAME of *Chlorella vulgaris* due to the effect of hydrodynamics in column photobioreactors (FBRC), varying aeration flows at (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm and continuous white light; the shear rate was analyzed to verify the probable presence of hydrodynamic stress. The shear rate data were low (26.34 a 45.60) s⁻¹, while the maximum values of cell growth and specific growth rate (μ) were (6.80 x 10⁶ cel mL⁻¹ y 0.023 d⁻¹), respectively, on the other hand, nitrogen consumption was 65% at 0.75 vvm and lipid productivity was 15.92 mgL⁻¹d⁻¹ at 1.25 vvm. In relation to the FAME, a greater presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was observed at 0.75 vvm, 1.75 vvm and 2.25 vvm; while at 1.25 vvm, they were saturated (SFA); the highest amount of monounsaturated (MUFA) was at 0.75 vvm. The components with the greatest presence were C12:0; C20:5N3; C24:1; C22:0; C22:2.

Keywords: FAME, aeration, *Chlorella vulgaris* photobioreactor, hydrodynamics

Introducción

La reducción del uso de combustibles fósiles es muy importante, para aminorar el problema de contaminación al ambiente que representan (Castillo et al., 2017). Es importante reducir el empleo de combustibles fósiles ya que provocan emisiones de CO₂, CH₄, N₂O, óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles distintos del metano (COVDM), así como de dióxido de azufre (SO₂), provocando daños a la atmósfera, (Chandrasekhar et al., 2015; Kumar et al., 2017; Kumar-Enamala et al., 2018). Por eso la importancia de buscar otras alternativas de energías renovables (Castillo et al., 2017; Anto et al., 2020).

Los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa como el biodiesel, son fuentes alternativas de energía que han recibido mayor atención para su investigación y aprovechamiento (Qaria et al., 2017; Ashok et al., 2019). De manera global la biomasa de microalgas podría satisfacer hasta un 25% de las necesidades energéticas, por las características de los compuestos de ácidos grasos de metil ésteres que pueden producir (Castillo et al., 2017). Por las aplicaciones para secuestro de CO₂, producir biocombustibles, alimentación humana y animal, además del aprovechamiento en la producción de biomoléculas de alta calidad, el uso de microalgas es para tomar en cuenta (Posten y Feng-Chen, 2016; Alishah et al., 2019; Gomez-Luna et al., 2022).

A pesar del número considerable de especies de microalgas existentes en diferentes hábitats, aproximadamente 30,000 especies han recibido más atención (Richmond 2004; Agarwal et al., 2018; Chew et al., 2018). Por ser microorganismos fotosintéticos, las microalgas pueden coexistir en diversos hábitats naturales; sin embargo, algunas microalgas pueden reproducirse de manera mixotrófica o heterotrófica (Castellanos et al., 2020). Ciertas microalgas contienen gran cantidad de lípidos, estos pueden incrementarse variando diferentes factores como: intensidad y tipo de luz, variaciones de temperatura, salinidad, intensidad de agitación, etc. (Posten and Feng-Chen 2016, Basto-Flores et al., 2022).

Algunas microalgas pueden acumular altas cantidades de triglicéridos (TAG), Kumar et al., (2018), que son la materia prima para producir biodiesel. La cantidad de biodiesel utilizando biomasa de microalgas no estriba nada más de la cantidad de biomasa, sino además de la cantidad de aceite contenida por célula. (Wu et al., 2017; Chew et al., 2018). Por su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones durante el cultivo, incluso aguas residuales, la microalga *Chlorella vulgaris* se ha utilizado para

experimentación en producción de biodiesel y otros compuestos de amplio uso (Li et al., 2012; Zhan et al., 2016).

Para el cultivo de microalgas se pueden utilizar sistemas abiertos, en forma de estanques, o sistemas cerrados o fotobiorreactores (FBR), para controlar mejor el proceso de cultivo, cantidad de lípidos y otros productos para su aprovechamiento en otras áreas (Kumar et al., 2018). Ambos tipos de sistemas de cultivo presentan ventajas y desventajas, de este modo, de las principales ventajas de los sistemas abiertos está su bajo costo, por los materiales que se utilizan para su construcción, sin embargo, el problema principal que presentan es la contaminación por microorganismos por su exposición al ambiente; mientras que los FBR presentan otras características, iluminación interna o externa, diferentes configuraciones, mejor control de las variables del tipo de proceso de cultivo y exhiben productividades superiores (Ashok et al., 2019); por estas características su desventaja principal es su costo, de ahí la necesidad de mejorar su diseño. En los FBR se pueden utilizar diferentes tasas de aireación que pueden influir en el crecimiento de las microalgas durante el proceso de cultivo, el mezclado ayuda a que las células tengan acceso a la fuente de luz y evita acumulación de oxígeno en el medio, impidiendo que las microalgas se adhieran a las paredes o que precipiten. (Deconinck et al., 2018; De Jesus et al., 2019). Algunas consideraciones en el diseño de FBR son: eficiencia para aprovechar la energía luminosa, fácil escalamiento, mezclado eficiente y mejor control de reacciones laterales, se sugiere bajo estrés hidrodinámico celular.

Dentro de las condiciones hidrodinámicas de importancia para un buen desempeño de los FBR de columna se pueden mencionar: gas hold up (gas remanente), velocidades superficiales de líquido y gas dentro del reactor, además de estimar la tasa de corte (Beal et al., 2015; Gonzalez-Lazo et al., 2019). Es necesaria una tasa de aireación adecuada, con la idea de evitar que las células sedimenten y se propicie muerte celular por ausencia de luz. De igual modo, existe un límite superior en el nivel aceptable de turbulencia, ya que las fuerzas hidrodinámicas tienen un efecto de estimulación sobre los procesos fisiológicos de las células algales. Un aumento progresivo de turbulencia, en algunas microalgas, favorece al aumento en la tasa de crecimiento, pues la agitación favorece el suministro de luz y CO₂. Sin embargo, con altos niveles de turbulencia, se disminuye el crecimiento, además aumenta de manera simultánea la velocidad superficial del gas ocasionando un posible daño celular (Trivedi et al., 2015; Gonzalez-Lazo et al., 2019). El esfuerzo de corte es uno de los principales problemas en el cultivo de microalgas debido al daño celular. El exceso de agitación causa turbulencia, afectando la estructura celular, disminuyendo el crecimiento y la producción de metabolitos. Por lo contrario, una agitación insuficiente provoca sedimentación y muerte celular. (Robles-Heredia 2014, Montoya 2021). El estrés hidrodinámico debido a la agitación mecánica y ruptura de burbujas en los FBR puede afectar el crecimiento y metabolismo de las microalgas (Arguelles et al., 2018; Alishah et al., 2019).

En este trabajo se analizó la variación de crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos y calidad del biodiesel en función del tipo de FAME de *Chlorella vulgaris*, por efecto de la hidrodinámica en fotobiorreactores de columna (FBRC), variando flujos de aireación a (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y luz blanca continua; además de la tasa de corte para comprobar probable presencia de estrés hidrodinámico. De aquí el interés por experimentar si a mayor flujo de aireación y con una iluminación discreta se podrían alcanzar mayores cantidades en la producción de biomasa y lípidos en la microalga.

Método

Con el siguiente proceso metodológico se realizaron diferentes determinaciones para conocer la variación del crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos y la calidad del biodiesel en función del tipo de componentes de metil ésteres presentes FAME de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores de columna (FBRC), alternando los flujos de aireación de (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y luz blanca continua.

Adaptación de la cepa

La cepa proviene del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), México. Se aclimató por 30 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para iluminación se utilizó luz blanca fría con lámparas fluorescentes con emisión a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en forma continua. Se realizaron transferencias a matraces Erlenmeyer de 250 mL.

Medio de cultivo

Para el medio a 90 mg L^{-1} de N-NH_4^+ (C_{90}), se agregaron 3 mL de nutrientes por L de agua con la siguiente composición: 7 mg NaCl, 4 mg CaCl_2 , 2 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg KH_2PO_4 , 115.6 mg NH_4Cl , disueltos en 1L de agua, de igual forma se adicionaron metales traza y vitaminas considerando la técnica para medio de cultivo f/2 (Guillar and Ryther 1962), la esterilización fue en autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y 30 atm; una vez frío el medio de cultivo se adicionaron 4 mL de vitaminas por cada litro de medio (Robles-Heredia, 2014).

Inóculo

Para el inóculo se utilizaron 500 mL de solución a C_{90} . Manteniendo agitación constante por 5 días, para obtener una concentración de 1×10^6 células mL^{-1} (cel x mL).

Crecimiento de células

Para verificar el desarrollo celular, cada 24 h se hizo conteo con cámara Neubauer Hematocitómetro de 0.1 mm; con altas densidades celulares, se realizaban diluciones de la muestra en 1:10 mL para facilitar el conteo, posteriormente el número de células total del conteo se multiplicaba por un factor de 10 de acuerdo a la dilución tomando en cuenta según fuera el caso las ecuaciones (1 y 2) (Ruiz-Marín et al., 2010):

$$\text{Cc} = \text{Células contadas} \times 10,000 \quad (1)$$

$$\text{Ccd} = \text{Células contadas} \times 10 \times 10,000 \quad (2)$$

Dónde: Cc representa el número de células contadas y Ccd representa el número de células en dilución

Biomasa peso seco

Se filtraron 10 mL del medio con microalgas utilizando filtro a peso constante, el filtro con la biomasa se introdujo en una estufa por 24 h a $130 \text{ }^\circ\text{C}$. Después, el filtro se colocó en un desecador para enfriarse, se obtuvo el peso de la muestra seca mediante diferencia de pesos, considerando el volumen de muestra utilizado. El proceso se realizó cada 24 h hasta el final del proceso (Robles-Heredia, 2014).

Consumo de nitrógeno

Se tomó una muestra de 50 mL de medio de cultivo cada 24 h, se filtró y se le agregaron 5 gotas de H_2SO_4 para fijar el nitrógeno, posteriormente la muestra se dividió en 2 matraces Erlenmeyer con 25 mL cada uno, se les agregó 5 mL de solución amortiguadora de boratos y 4 gotas de NaOH 6N. Se agregó solución indicadora de ácido bórico en 2 matraces, cada una de 20 mL y se les agregó 3 gotas de indicador Shiro Toshiro. Posteriormente las muestras se destilaron en equipo Buchi micro Kjeldahl y se

colectaron 50 mL en los matraces con la solución de ácido bórico y se titularon con H₂SO₄ 0.02 N hasta que la solución viró de verde a morado. La concentración de N-NH₄⁺ se determinó con la siguiente ecuación (3) (Robles-Heredia, 2014):

$$N - NH_4^+ = \frac{\text{Volumen de ácido gastado} \times 0.02N \times 14}{\text{Volumen de muestra}} \times 1000 \quad (3)$$

Dónde: N-NH₄⁺ representa concentración de nitrógeno amoniacal; 0.02N representa la normalidad del ácido sulfúrico; 14 y 1,000 representan valores constantes.

Cosecha

Después del proceso de cultivo, el volumen remanente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa microalgal. La biomasa recuperada se congeló a -4.0°C para su conservación, posteriormente se liofilizó por espacio de 3 a 5 días (Ruiz-Marín et al., 2010).

Producción de aceite

Se usó el método de Bligh y Dyer (1959) modificado: en tubos con rosca se colocaron 10 mg de biomasa liofilizada, se adicionaron 4 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua destilada, esta mezcla se sometió a ultrasonido por 15 minutos para romper pared celular y se cubrieron con papel aluminio, se incubaron por 24 h a 4 °C; después, se les retiró el papel aluminio para someterlas a ultrasonido por 5 min y se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min, el líquido remanente se trasladó a nuevos tubos con tapa de rosca y se agregaron 4 mL de agua para su lavado, se agitaron y nuevamente fueron centrifugadas, el agua de los tubos se retiró con pipeta Pasteur, se vaporizó el cloroformo en baño María y se les agregó 2 mL de mezcla ácido clorhídrico-metanol al 95%, se colocaron en digestor marca Hach DRB 200 por 1 h a 100 °C; después, se envolvieron nuevamente en papel aluminio para su resguardo en refrigeración por 24 h a 4 °C. Después, se les agregó 3 ml de hexano y se agitaron, para formar una bi-fase de la cual se extrajo la parte inferior con pipeta Pasteur, se agregaron 4 mL de agua a los tubos y se agitaron nuevamente, se extrajo el agua utilizando una pipeta Pasteur. Se envolvieron nuevamente en papel aluminio y se mantuvieron refrigeración por 24 h a 4 °C. Pasando el tiempo estimado, se vaporizaron con baño maría, en el proceso de vaporización se agregaron 3 mL de hexano antes de completar vaporización, las muestras se transfirieron a viales y se dejaron reposar por 24 h. El contenido de lípidos se traduce a una composición de lípidos (% ww⁻¹) en base seca w, y esta a su vez se traduce en una productividad de lípidos P_L (en mg L⁻¹ d⁻¹) con la siguiente ecuación (4):

$$P_L = \frac{w_2 X_2 - w_1 X_1}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

Dónde: X₁ y X₂ es la concentración másica de biomasa seca en el medio al tiempo t₁ y t₂ (inicial y final). w contenido de lípidos en base seca. P_L productividad de lípidos en unidades de mg L⁻¹ d⁻¹

Obtención de metil ésteres de ácidos grasos.

El perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés) se obtuvo usando un equipo de cromatografía de gases marca Agilent Technology 7890. Se inyectó 1 µL de la solución hexano-lípido al cromatógrafo con detector de ionización de flama (FID), y con columna de separación DB-23 (60 m longitud, 0.32 mm ID, 0.25 µm espesor). Condiciones cromatográficas: T del detector: 250 °C; T del inyector: 250 °C; Programa de temperatura del horno: 120 °C por 5 min, aumentar la temperatura a razón de 10 °C min hasta 180 °C, mantener por 30 min. se aumentó nuevamente temperatura a razón de 10 °C min hasta 210 °C y mantener por 21 min. (total 65 min); Flujo gas portador: 15 psi; Split: 1:100; Gas portador: He alta pureza. Para identificar los componentes

FAME se utilizó un estándar de mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (% peso) Supelco™ 37 Componente FAME. Los resultados del diseño experimental se estimaron con análisis de varianza (ANOVA) factorial completa (α : 0.05) utilizando software STATISTICA V7.

Montaje de los Fotobiorreactores de Columna (FBRC)

Para el sistema FBRC se utilizaron botellas de material PET con 2 L de volumen de operación y otras con volumen de 1L; para evitar evaporación del medio se usó agua destilada para hidratar el aire inyectado; el aire saliente se burbujea en agua-cloro para evitar contaminación exterior, se emplearon mangueras de ¼ pulgada para inyección del aire; se emplearon flujómetros de acrílico transparente para control de aire, verticales Cole Parmer, Modelo ACRY-010052, nivel de aire 2-8 Lmin⁻¹ y carátula tipo regleta; compresor de 2.5 Hp de potencia y 8.5 kg cm⁻² de presión para inyectar el aire. Iluminación externa con luz blanca fría fluorescente a 100 μmol m⁻² s⁻¹. En La Figura 1 indican ciertas variables para realizar cálculos hidrodinámicos.

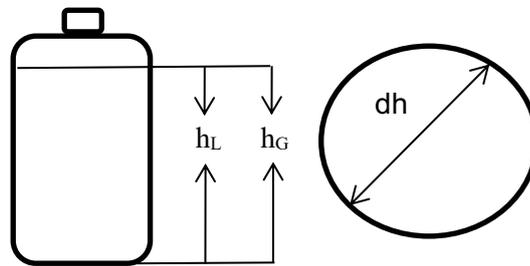


Figura 1. Equipo de columna de burbujeo (FBRC)

Donde las variables indicadas son las siguientes: h_L es la altura del líquido en reposo sin entrada de aire (m); h_G es la altura de la columna incluyendo la retención de gas (m); dh es el diámetro de la columna de burbujeo (m); A_c área transversal de la columna (m²) y ρ_L es la densidad del líquido

Aireación

Se consideraron cuatro tasas de aireación (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm por experimento, con una variable respuesta (productividad de lípidos), una configuración (FBRC) y dos repeticiones.

Para calcular la tasa de corte los datos de altura de columna (h_G) fueron (0.21, 0.22, 0.23 y 0.24) para cada flujo de aireación respectivamente; los siguientes datos fueron considerados como constantes para todos los experimentos: $h_L = 0.205$ m; $d_o = 0.12$ m; $A_c = 0.036$ m²; $\rho_L = 998$ kg / m³.

La ecuación (5) se considera para calcular el flujo de aire total corregido por la presión absoluta en el fondo del reactor (Robles-Heredia, 2014).

$$F_g = F_a \left(\frac{1}{60} \right) \left(\frac{1}{1000} \right) \quad (5)$$

Dónde: F_g es el flujo de aire total expresado en (m³s⁻¹) y F_a el flujo de aire suministrado en (L min⁻¹)

Con las ecuaciones (6) y (7) se calcularon el área seccional de la columna (A_c) en (m²) y la velocidad superficial del gas (U_g), que es el flujo de gas por unidad de área dentro del sistema en (ms⁻¹), de acuerdo a Babcock et al, (2002).

$$A_c = b \times h \quad (6)$$

$$U_g = \frac{F_g}{A_c} \quad (7)$$

Con U_g para columna de burbujeo, la tasa de corte (\bar{V}) expresada en (s^{-1}) se calcula con ecuación (8) válida en el rango de $0.008 < U_g < 0.09 \text{ ms}^{-1}$. (Cerri et al., 2008).

$$\bar{V} = 1000U_g^{0.5} \quad (8)$$

El gas retenido ε se calcula con la ecuación (9); determina el porcentaje de gas o aire retenido dentro del equipo por el incremento del volumen de aire cuando este es inyectado (Doran, 1995).

$$\varepsilon = \frac{h_G - h_L}{h_G} \quad (9)$$

Con la ecuación (10) se calcula la velocidad superficial del líquido; que es el flujo de líquido por unidad de área dentro del sistema, se puede calcular para columnas de burbujeo con un diámetro entre 0.1 y 7.5 m y $0 < U_g < 0.4 \text{ ms}^{-1}$ (Doran, 1995)

$$U_L = 0.9(gdoU_g)^{0.33} \quad (10)$$

Donde U_L es la velocidad superficial del líquido en (m s^{-1}), g es aceleración de la gravedad en (ms^{-2}), do es el diámetro de la columna en (m) y U_g velocidad superficial del gas o aire inyectado.

La ecuación (11) calcula potencia neumática, potencia generada por el aire inyectado al equipo para agitación del fluido dentro del FBRC. (Doran, 1995):

$$\frac{PG}{VL} = \rho_L g U_g \quad (11)$$

Dónde: PG/VL es la potencia neumática en (Wm^{-3}), calculada con ρ_L que es la densidad del líquido en (kg / m^3), g es la gravedad en (ms^{-2}) y U_g la velocidad superficial del gas o aire inyectado. El uso de distintos flujos de aireación fue con la finalidad de establecer las mejores condiciones de aireación, definiendo Tasa de Corte (\bar{V}), con la finalidad de verificar el efecto sobre los ácidos grasos de metil ésteres, desarrollo celular, producción de biomasa, agotamiento de nitrógeno, y productividad de lípidos.

Resultados y discusión

A continuación, se indican los resultados obtenidos del presente trabajo.

La Tabla (1) indica los cálculos hidrodinámicos del FBRC a las tasas de aireación propuestas.

Tabla 1
Datos hidrodinámicos

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	F_a (Lm^{-1})	$F_g \times 10^{-5}$ (m^3s^{-1})	$U_g \times 10^{-3}$ (ms^{-1})	ε (%)	$U_L \times 10^{-2}$ (ms^{-1})	PG/VL (Wm^{-3})	\bar{V} (s^{-1})
FBRC	0.75	1.5	2.50	0.694	2.38	9.57	6.80	26.34
	1.25	2.5	4.16	1.150	6.81	10.18	11.26	33.91
	1.75	3.5	5.83	1.620	10.86	11.40	15.86	40.25
	2.25	4.5	7.50	2.080	14.58	12.40	20.36	45.60

Se puede indicar que las células algales no presentaron algún tipo de deformación a las condiciones planteadas de aireación; aspectos similares fueron reportados por (Shi et al., 2016; Sadeghizadeh et al., 2017); según se observa en la Tabla (1), los valores obtenidos de la hidrodinámica de los FBRC, conforme incrementaron los flujos de aireación, aumentaron también todos los parámetros hidrodinámicos lo que indicó la

estrecha relación en cada uno de ellos, además de la posible afectación con los demás parámetros celulares que se plantean en este trabajo.

La Tabla (2) indica crecimiento celular, tasa específica de crecimiento (μ) y consumo de nitrógeno obtenidos a los diferentes flujos de aireación sugeridos.

Tabla 2

Crecimiento celular, tasa específica de crecimiento (μ) y consumo de nitrógeno obtenidos a los diferentes flujos de aireación sugeridos

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	Max crecimiento* celular (cel $\times 10^6$ mL $^{-1}$)	μ^* (h $^{-1}$)	Consumo* N-NH $_4^+$ (%)
FBRC	0.75	6.80 \pm 0.03 ^a	0.0230 \pm 0.09 ^a	65.00 \pm 0.08 ^a
	1.25	3.10 \pm 0.13 ^b	0.0170 \pm 0.06 ^b	53.00 \pm 0.07 ^b
	1.75	2.51 \pm 0.12 ^b	0.0165 \pm 1.70 ^b	50.00 \pm 0.93 ^b
	2.25	2.49 \pm 0.03 ^b	0.0160 \pm 0.50 ^b	47.00 \pm 0.05 ^b

Nota: *Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a prueba Tukey ($p \geq 0.05$); (\pm Desviación estándar).

Por otra parte, según los valores de crecimiento celular máximo de Tabla (2), se puede indicar que en relación con el crecimiento celular a 0.75 vvm, las células se adaptaron para incrementar su desarrollo, alcanzando 6.80 x 10⁶ cel mL⁻¹ y la mayor tasa de crecimiento específico μ (0.023 h⁻¹); no obstante, conforme se incrementó la tasa de aireación, se redujeron el crecimiento celular más del 50% (3.10 x 10⁶) cel mL⁻¹, así como, la tasa de crecimiento específico en todos los experimentos. Se puede mencionar que los resultados obtenidos de crecimiento y remoción de nitrógeno (N-NH $_4^+$), estuvieron muy por debajo de otros trabajos (Kee-Lam et al., 2016; Sadeghizadeh et al. 2017, Anto et al., 2020; Montoya, 2021).

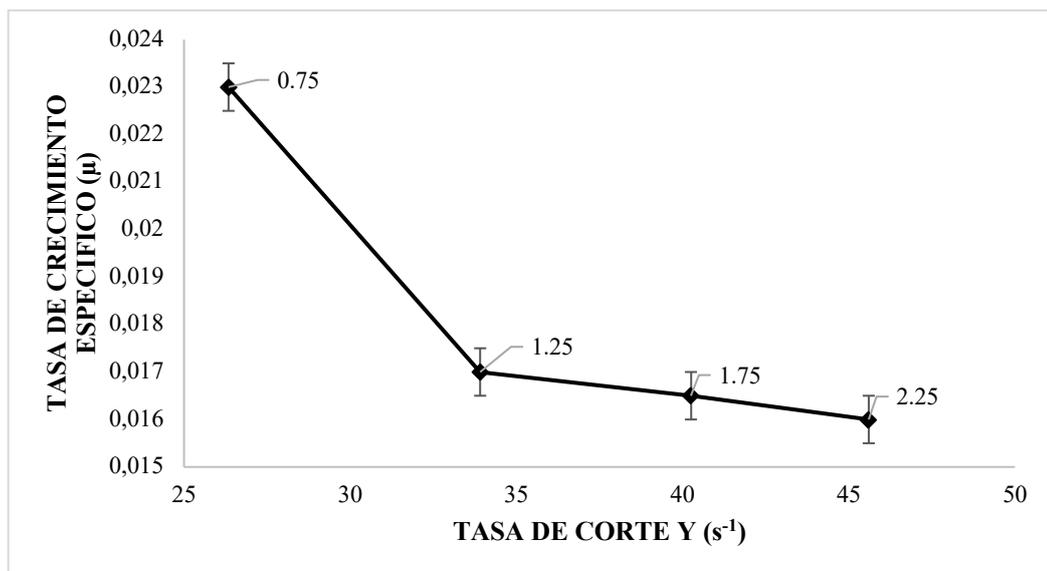


Figura 2. Tasa de crecimiento μ vs tasa de corte γ

De acuerdo a la Figura 2 se aprecia que conforme el flujo de aireación incrementaba, del mismo modo aumentaban los valores de las tasas de corte en cada experimento, lo que puede indicar que hubo una relación directa entre estos dos parámetros, no obstante, ocurrió lo contrario con la tasa de crecimiento específico (μ). Por tanto, se puede inferir que existió una relación inversamente proporcional con estos dos aspectos, a mayor aireación, mayor tasa de corte (γ), pero menor tasa de crecimiento celular (μ), de este modo se puede considerar que el flujo de aire óptimo sería a 1.25 vvm para realizar otros experimentos, según el producto a obtener, considerando otros factores de operación o de iluminación.

En la Tabla (3) se indican los datos de biomasa peso seco, contenido de lípidos y productividad de lípidos en *Chlorella vulgaris* a las tasas de aireación propuestas.

Tabla 3

Biomasa seca X, contenido de lípidos w y productividad de lípidos P_L a las tasas de aireación propuestas

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	X (g L ⁻¹)	w _{max} (%ww ⁻¹)	P _L máxima (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
FBRC	0.75	0.295±0.056 ^a	11.54 ± 0.03 ^a	3.99 ± 0.026 ^a
	1.25	1.395±0.010 ^b	14.28 ± 0.02 ^b	15.92 ± 0.019 ^b
	1.75	0.430±0.041 ^a	11.11 ± 0.02 ^a	7.28 ± 0.016 ^a
	2.25	0.405±0.050 ^a	10.00 ± 0.04 ^a	1.58 ± 0.016 ^a

Nota: *Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a prueba Tukey ($p \geq 0.05$); (\pm Desviación estándar)

De manera general, en este trabajo los valores alcanzados de productividades fueron bajos, comparados a otros reportes (Al-Ameri y Al-Zuhair 2019; De Jesus et al., 2019), sin embargo a 1.25 vvm, se observó la mayor productividad de lípidos (Tabla 3); aun cuando a 0.75 vvm se obtuvo el mayor crecimiento celular, se puede indicar entonces que, las células a 1.25 vvm resintieron el grado de agitación, probablemente ocurrió un ligero estrés por tasa de corte, lo que indujo a que produjeran mayor contenido de lípidos, incrementando la productividad, no obstante, conforme aumentó la tasa de aireación se presentaron condiciones desfavorables para la producción de lípidos. Otros reportes indican datos de 1.2 g L⁻¹ de biomasa a diferentes grados de agitación, utilizando intensidades lumínicas mayores o cercanas a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Chiu et al., 2008, Montoya, 2021), mientras que Pham et al., (2017) reportan 1.35 g L⁻¹ de biomasa a 0.3 vvm, con iluminación de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; por lo que se puede inferir, que la cantidad de luz proporcionada, favorece más en la obtención de biomasa que la aireación. De igual modo, otros estudios han reportado que, a una iluminación superior a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se alcanzaron mayores aumentos de biomasa (Jiang et al., 2016; Kim et al., 2015; Alishah et al., 2019; Castellanos et al., 2020).

La Tabla (4) muestra los principales ácidos grasos de metil ésteres producidos por la microalga, tomando en cuenta las condiciones de cultivo planteados.

Tabla 4.

Principales ácidos grasos de metil ésteres producidos por la microalga. (En % en peso total de ácidos grasos)*

FAME	0.75 vvm	1.25 vvm	1.75 vvm	2.25 vvm
------	----------	----------	----------	----------

C12:0	23.81 (±0.38)	22.04 (±0.71)	23.73 (±2.02)	20.91 (±5.08)
C13:0	0.96 (±0.27)	0.93 (±0.14)	0.39 (±0.02)	0.84 (±0.69)
C18:0	1.78 (±0.07)	1.48 (±0.038)	1.6 (±0.13)	1.61 (±0.10)
C20:0	0.93 (±0.04)	n.d.	0.21(±0.11)	0.44 (±0.005)
C21:0	n.d.	n.d.	0.27(±0.04)	0.23(±0.07)
C22:0	5.25 (±6.95)	13.36 (±2.25)	8.83 (±8.73)	10.54 (±11.32)
C23:0	0.58 (±0.006)	1.23 (±0.079)	1.22 (±0.061)	1.49 (±0.25)
C17:1	0.85 (±0.11)	0.18 (±0.05)	0.28 (±0.45)	0.49 (±0.073)
C18:1N9T	0.06 (±1.09)	n.d.	n.d.	n.d.
C20:1	1.84 (±0.10)	0.5 (±0.31)	0.82 (±0.074)	1.28 (±0.15)
C22:1N9	2.01 (±0.11)	1.77 (±1.63)	2.6 (±0.20)	2.39 (±0.51)
C24:1	17.22 (±2.71)	7.55 (±1.63)	11.81 (±0.48)	13.1 (±5.41)
C18:2N6T	n.d.	n.d.	n.d.	0.27(±13.06)
C20:2	7.82 (±0.63)	0.46 (±0.053)	7.48 (±8.20)	8.31 (±9.03)
C20:3N3	n.d.	n.d.	0.34(±10.30)	0.74(±7.04)
C20:3N6	0.22 (±0.14)	0.17 (±0.093)	0.24 (±0.13)	0.25 (±0.16)
C20:4N6	3.32 (±0.2)	2.41 (±0.40)	2.98 (±0.13)	2.46 (±0.88)
C20:5N3	21.71 (±2.51)	15.34 (±3.02)	24.14 (±0.81)	24.38 (±8.37)
C22:2	8.35 (±0.31)	9.66 (±1.60)	14.71 (±1.88)	20.46 (±8.49)
C22:6N3	1.78 (±0.25)	1.17 (±0.05)	1.47 (±0.085)	1.51 (±0.34)
SFA	33.34(±8.57) ^a	39.07(±8.67) ^a	36.29(±8.73) ^a	36.10(±7.83) ^a
MUFA	22.00(±7.21) ^a	10.03(±4.97) ^b	15.53(±4.97) ^b	17.27(±5.46) ^b
PUFA	43.23(±7.39) ^a	29.24(±8.75) ^b	51.39(±8.75) ^a	58.43(±9.74) ^a

Nota: *Porcentajes en peso, Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ($p \geq 0.05$); n.d.=no detectado, (\pm Desviación estándar).

Los compuestos de metil ésteres (Tabla 4) de ácidos grasos que predominaron fueron los poliinsaturados (PUFA), ya que estuvieron presentes a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm; no obstante, a 1.25 vvm, se alcanzó mayor presencia de ácidos grasos saturados (SFA). Los elementos en mayor cantidad fueron C12:0; C20:5N3; C24:1; C 22:0; C22:2 de manera similar a los reportado por: (Al-Ameri y Al-Zuhair 2019; Alishah et al., 2019).

El análisis de varianza, mostró que no existió diferencia significativa entre SFA y PUFA; del mismo modo los monoinsaturados (MUFA) a 1.25, 1.75 y 2.25 vvm no revelaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$), mientras que a 0.75 el valor de los MUFA fue ligeramente mayor. Por los ácidos grasos obtenidos, se puede decir que el incremento en la aireación en los FBRC favoreció la mayor producción de PUFA, sobre todo a 1.75 vvm y 2.25 vvm, contribuyendo en las características del biocombustible; es recomendable que la composición de los lípidos sean ácidos grasos de cadena larga, con bajo grado de insaturación para evitar emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del combustible tales como el número de cetanos (NC) y estabilidad oxidativa (EO) (Knothe, 2010, Basto-Flores et al., 2022).

Considerando que dentro de las principales propiedades de los combustibles se encuentra el NC (número de cetanos), el cual de manera adimensional describe la calidad de ignición de un combustible y se relaciona con el tiempo de retardo de la ignición que experimenta un combustible (Arguelles et al., 2018); según el análisis FAME, debido a las mayores cantidades detectadas de PUFA en los experimentos, se puede indicar que el biodiesel sería de baja calidad considerando la baja presencia de ácidos grasos saturados.

Conclusiones

Por lo anterior se puede concluir que la tasa de aireación a 0.75 vvm fue la más apropiada para obtener un mayor crecimiento celular, pero hay que observar que, a 1.25 vvm ocurrió un mayor incremento en el contenido de lípidos y por tanto en la productividad de lípidos. El régimen de trabajo estuvo en el rango de flujo de tipo burbujeo homogéneo, por las características del reactor y la velocidad superficial del gas.

De acuerdo a las condiciones planteadas, en relación al crecimiento celular, lo conveniente sería manejar una tasa de aireación de 0.75 vvm; por otra parte, para que se obtenga mayor producción de lípidos, la tasa de aireación sería a 1.25 vvm, por tanto se podría considerar un proceso de cultivo primero creciendo las células y posteriormente a las condiciones con agitación de 1.25 vvm para continuar el cultivo, tomando en cuenta las concentraciones de nutrientes, el tipo de iluminación y verificando la productividad.

Importancia del estudio, fortalezas y debilidades

Este estudio se realizó con la finalidad de conocer e interpretar el efecto de la aireación y algunos parámetros hidrodinámicos como la tasa de corte (\bar{V}), sobre la producción de ácidos grasos de metil ésteres (FAME) principalmente, aunado al hecho de determinar de igual modo si estos cambios en la aireación benefician otros parámetros como el crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos, además utilizar correlaciones para determinar en función de los FAME la calidad del biodiesel, de acuerdo tipo de componentes de metil ésteres presentes a flujos de aireación planteados.

En relación a las fortalezas se puede indicar que se tiene un planteamiento metodológico adecuado para calcular la hidrodinámica en los fotobiorreactores y otras determinaciones, el conocimiento para poder interpretar los resultados obtenidos, además de contar con equipamiento para realizar la parte experimental, sobre las áreas de oportunidad se puede señalar que es necesario continuar experimentando, considerando otros factores operacionales, considerar mayor análisis de las determinaciones y profundizar más en relación estos.

Referencias

- Agarwal, A., Rana, M., & Park, J. H. (2018). Advancement in technologies for the depolymerization of lignin. *In Fuel Processing Technology* (Vol. 181, pp. 115–132). Elsevier B.V.
- Al-Ameri, M. & Al-Zuhair, S. (2019). Using switchable solvents for enhanced, simultaneous microalgae oil extraction-reaction for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, 141, 217–224.
- Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *In Microbial Cell Factories* (Vol. 18, Issue 1, pp. 1–17). BioMed Central Ltd.

- Anto, S., Mukherjee, S. S., Muthappa, R., Mathimani, T., Deviram, G., Kumar, S. S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*, 242, 125079.
- Arguelles, E. D., Laurena, A. C., Monsalud, R. G., & Martínez-Goss, M. R. (2018). Fatty acid profile and fuel-derived physicochemical properties of biodiesel obtained from an indigenous green microalga, *Desmodesmus* sp. (I-AU1), as potential source of renewable lipid and high quality biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 411–419.
- Ashok, V., Shriwastav, A., Bose, P., & Gupta, S. K. (2019). Phycoremediation of wastewater using algal-bacterial photobioreactor: Effect of nutrient load and light intensity. *Bioresource Technology Reports*, 7(March), 100205.
- Babcock, R.W., Malda, J., & Radway, C. (2002). Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 14, 169-184.
- Basto-Florez, L. E., Millán-Alvarado, S. A., Medina-Caballero, L. F., Mora-Vergara, L. Z., & Caballero-Hernández, Y. T. (2022). Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 41-53
- Beal, C.M., Gerber, L.N., Sills, D.L., Huntley, M.E., Machesky, S.C., & Walsh, M. J. (2015). Algal biofuel production for fuels and feed in a 100-ha facility: a comprehensive techno-economic analysis and life cycle assessment. *Algal Res-Biomass Biofuels Bioprod*, 10, 66–79.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 8, 911–917.
- Castillo, Omar S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Castellanos, I. C., González-Peralta, K., & Pinzón-Torres, S. J. (2020). Microalgas como alternativa sostenible para la producción de biodiesel. *Revista Ontare*, 6. <https://doi.org/10.21158/23823399.v6.n0.2018.2425>
- Cerri, M.O., Futiwaki, L., Cruz, A.J., & Badino, A.C. (2008). Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 51–57
- Chandrasekhar K, Lee Y-J., & Lee D-W. (2015). Biohydrogen production: strategies to improve process efficiency through microbial routes. *Int J Mol Sci Int J Mol Sci*, 16, 8266–93.
- Chew K.W., Chia S.R., Show P.L., Yap Y.J., Ling T.C., & Chang J.S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 1–13.
- Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. & Lin, C. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99(9), 3389-3396.

- De Jesus, S. S., Ferreira, G. F., Moreira, L. S., Wolf Maciel, M. R., & Maciel Filho, R. (2019). Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. *Renewable Energy*, *143*, 130–141.
- Deconinck, N., Muylaert, K., Ivens, W., & Vandamme, D. (2018). Innovative harvesting processes for microalgae biomass production: A perspective from patent literature. In *Algal Research* (Vol. 31, pp. 469–477). Elsevier B.V.
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. London: Academic Press Limited.
- Gómez-Luna, L., Tormos-Cedeño, L., & Ortega-Díaz, Y. (2022). Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. *Tecnología Química*, *42*(1), 70-93. Epub 30 de abril de 2022.
- González Lazo, Y., Rodríguez Ramos P.A., Sánchez Borroto, Y.S., et al. (2019). Diseño y simulación de un fotobiorreactor para el cultivo de la microalga *Chlorella Vulgaris*. *Ing. Mecánica*. *22*(3), 169-77.
- Guillard, R.R.L., & Ryther, J.H. (1962) Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) *Gran. Canadian Journal of Microbiology*, *8*, 229-239.
- Jiang, L., Ji, Y., Hu, W., Pei, H., Nie, C., Ma, G. & Song, M. (2016). Adjusting irradiance to enhance growth and lipid production of *Chlorella vulgaris* cultivated with monosodium glutamate wastewater. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* *162*(1), 619-624.
- Kee-Lam, M., Iqram-Yusoff, M., Uemura, Y., Wei-Lim, J., Gek-Khoo, C., Teong-Lee, K. & Chyuan-Ong, H. (2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, *103*(1), 197-207.
- Kim, J., Lee, J. & Lu, T. (2015). A model for autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under photolimitation and photoinhibition in cylindrical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, *99*(1), 55-60.
- Knothe, G. (2010). Calidad del combustible biodiesel y la norma astm. *Palmas* *31*(Especial), 162-171.
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Pugazhendhi, A., Thi, NBD., Zhen G., & Chandrasekhar K. (2017). A comprehensive overview on light independent fermentative hydrogen production from wastewater feedstock and possible integrative options. *Energy Convers Manag*, *141*, 390–402.
- Kumar-Enamala M., Enamala S., Chavali M., Jagadish D., Yadavalli R., Kolapalli B., Vasu-Aradyula T., Velpuri J., y Kuppam Ch. (2018). Production of biofuels from microalgae. A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *94*, 49–68.
- Montoya, A. (2021). Cultivo de Microalgas. CITED 2021, Quito, Ecuador
- Pham, H., Kwak, H. S., Hong, M., Lee, J., Chang W. S. & Sim, S. J. (2017). Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresource Technology*. *239*(1), 211-218.

- Posten C. & Feng-Chen S. (Ed.). (2016). *Microalgae biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Hannover, Germany: Editorial Springer International Publishing.
- Qaria H., Rehana M., & Nizami A.S. (2017). 9th International Conference on Applied Energy, ICAE2017, 21-24 August 2017, Cardiff, UK Key. Issues in Microalgae Biofuels: A Short Review. *Energy Procedia*, 142, 898–903.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.
- Robles Heredia, J.C. (2014). Evaluación de la productividad de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* bajo dos modos de limitación de nitrógeno en fotobiorreactores tipo airlift y columna de burbujeo. [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L., & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64.
- Sadeghizadeh, A., Farhad dad F., Moghaddasi, L. & Rahimi R. (2017). CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243(1), 441-447.
- Shi, J., Pandey, P. K., Franz, A. K. Deng, H., & Jeannotte, R. (2016). *Chlorella vulgaris* production enhancement with supplementation of synthetic medium in dairy manure wastewater. *AMB Express*, 6(15), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0184-1>
- Trivedi J., Aila M., Bangwal D.P., Kaul S., & Garg M.O. (2015). Algae based biorefinery—how to make sense? *Renew Sustain Energy Rev.*47, 295–307.
- Wu J., Alam M.A., Pan Y , Huang D., Wang Z., & Wang T. (2017). Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. *Journal Taiwan Institute Chemical Engineering*, 71, 32-39.
- Zhan J , Zhang Q , Qin M., y Hong Y. (2016). Selection and characterization of eight fresh- water green algae strains for synchronous water purification and lipid production. *Front Environ Sci Eng*, 10(3), 548–58.

Fecha de recepción: 31/05/2022

Fecha de revisión: 30/06/2022

Fecha de aceptación: 12/07/2022