

Comparación de la producción de biodiesel de *Chlorella Protothecoides* y *Scenedesmus Sp* mediante la adición de CO₂ de la fermentación alcohólica

HERNÁNDEZ-ROJO, Abigail†, JIMÉNEZ-ISLAS, Donaji y VENEGAS-SÁNCHEZ, Josué Addiel*

Recibido Febrero 10, 2017; Aceptado Agosto 26, 2017

Resumen

Los combustibles fósiles, se encuentran en un estado crítico de producción y un aumento de precios considerable en sus derivados, una opción para disminuir el consumo de estos es producir biocombustibles. La producción de biodiesel a partir de microalgas es una alternativa viable debido a que su tasa crecimiento es alta, además de una eficiencia fotosintética considerable y significativa producción de biomasa comparada con otros cultivos energéticos. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de la especie *Chlorella protothecoides* y *Scenedesmus Sp* de manera autótrofa, usando como fuente de Carbono el CO₂ obtenido de la fermentación alcohólica. Además se llevara a cabo la comparación de la producción de biodiesel.

Microalgas, biocombustibles, biodiesel, ácidos grasos

Abstract

Fossil fuels are in a critical state of production and a considerable price increase in their derivatives, an option to reduce the consumption of these products produce biofuels. The biodiesel production of microalgae is a viable alternative due to the high grow rate, also a significant photosynthetic efficiency and high biomass production compared to other energy crops. In this paper, the rate of growing of microalgae *Chlorella protothecoides* and *Scenedesmus Sp* was evaluated in an autotrophic medium using as carbon source CO₂ from an alcoholic fermentation and CO₂ present in the atmosphere was evaluated.

Microalgae, biofuels, biodiesel, fatty acid

Citación: HERNÁNDEZ-ROJO, Abigail, JIMÉNEZ-ISLAS, Donaji, VENEGAS-SÁNCHEZ, Josué Addiel. Comparación de la producción de biodiesel de *Chlorella Protothecoides* y *Scenedesmus Sp* mediante la adición de CO₂ de la fermentación alcohólica. *Revista de Sistemas Experimentales*. 2017, 4-12: 11-17

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: javenegas@iteshu.edu.mx)

†Investigador contribuyendo como primer autor.

La necesidad de generar energía aumenta de forma exponencial debido al aumento de la población. En la actualidad se busca generar energía a través de distintas fuentes con el fin de disminuir la dependencia de los combustibles fósiles y reducir las emisiones de gases contaminantes. Una forma de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero es el uso de biocombustibles en lugar de combustibles fósiles y biodiesel es un tal sustituto que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero.

En los últimos años han surgido investigaciones para la obtención de los mismos, particularmente biodiesel a través de microalgas, ya que son una opción viable para la obtención de lípidos transesterificables, por la cantidad de lípidos similares comparados con granos de algunos cultivos energéticos [1]. La producción de biodiesel a través de microalgas es una opción viable debido a la alta tasa de crecimiento celular que poseen las microalgas. El contenido promedio de lípidos en microalgas varía entre 20 y 40 % del peso celular seco (PS) [2].

Las microalgas constituyen un grupo muy diverso de organismos unicelulares procariotas o eucariotas fotosintético, es decir, al igual que las plantas, convierten la energía solar en energía, pero por lo general son más eficientes debido a su sencilla estructura celular y además porque sus células crecen en ambientes acuosos (agua dulce o salada), teniendo más acceso al agua, CO₂ y otros nutrientes de fácil disponibilidad [17].

El porcentaje de lípidos almacenados varía de acuerdo a las condiciones de cultivo en las que se encuentre el medio de cultivo. El proceso del crecimiento de la biomasa microalgal requiere luz, CO₂, agua y nutrientes inorgánicos, estos pueden ser nitratos, fosfatos, hierro y algunos elementos traza [4, 5,6].

Para la producción de biodiesel a través de microalgas es preciso extraer los lípidos a través de diversos métodos como el método soxhlet usando como solvente hexano. Siendo el biodiesel una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos obtenidos por transesterificación (reacción de intercambio de éster) de aceites vegetales o grasas animales.

La transesterificación es una reacción de múltiples pasos, incluyendo tres pasos reversibles en una serie, donde los triglicéridos se convierten en diglicéridos; entonces diglicéridos se convierten a monoglicéridos, monoglicéridos y se convierten luego en ésteres (biodiesel) y glicerina (subproducto). Ver figura 1. [5].

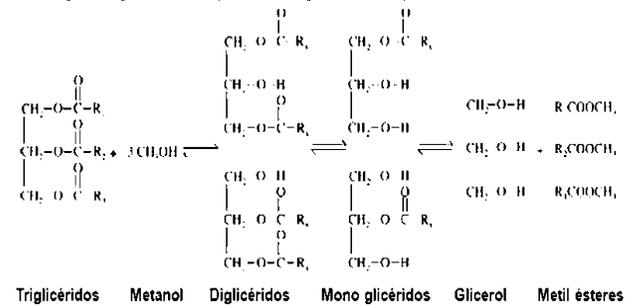


Figura 1 Reacción general de transesterificación

Existen distantes maneras de realizar la transesterificación de ácidos grasos, una de ellas es la síntesis Biodiesel a través de método de ultrasonido. Este proceso se realiza a través de la sonicación intensa de líquidos genera ondas sonoras que se propagan a los medios líquidos dando como resultado ciclos alternos de alta presión y baja presión.

Durante el ciclo de baja presión, se crean pequeñas burbujas de vacío de alta intensidad en el líquido. Cuando las burbujas alcanzan un cierto tamaño, se derrumban violentamente durante un ciclo de alta presión. Esto se llama cavitación.

Durante la implosión se producen localmente presiones muy altas y chorros de líquido de alta velocidad. Las fuerzas cortantes resultantes rompen mecánicamente la estructura celular y mejoran la transferencia de material. Este efecto apoya la extracción de lípidos de las algas. [14].

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar los porcentajes de ácidos grasos y obtención de biodiesel en las microalgas *Chlorella protothecoides* y *Scenedesmus Sp*, las cuales crecieron de manera autótrofa en medio Basal Bold mantenida con el CO₂ proveniente de una fermentación alcohólica y el CO₂ presente en el ambiente. Los lípidos se extrajeron en el equipo soxhlet usando como solvente hexano y posteriormente se llevó a cabo la síntesis de biodiesel a través del método en ultrasonido.

Condiciones de cultivo en microalgas

Las cepas se obtuvieron en medio sólido por medio del CINVESTAV, por lo tanto se adaptaron las cepas en medio Basal Bold (ver tabla 1). Las microalgas se mantuvieron a temperatura ambiente, en fotoperiodo 12:12 a 2500 luxes medidos con un luxómetro (MAVOLUX 5032B USB) y pH de 7.5. Se realizaron los experimentos en contenedores de 4000 ml, se les adiciono CO₂ obtenida la fermentación alcohólica y el CO₂ presente en el ambiente de manera continua (350-400 ppm).

Reactivo	Stock	Cantidad
NaNO ₃	10g/400ml H ₂ O	30ml/L
CaCl ₂ -2 H ₂ O	1g/400ml H ₂ O	10ml/L
MgSO ₄ -7 H ₂ O	3g/400ml H ₂ O	10ml/L
K ₂ HPO ₄	3g/400ml H ₂ O	10ml/L
KH ₂ PO ₄	7g/400ml H ₂ O	10ml/L
NaCl	1g/400ml H ₂ O	10ml/L
P-IV I Solución de Metales	ver tabla 2	40 ml/L
Solución Soliwater	ver tabla 3	6 ml/L

Tabla 1 Medio de cultivo Basal Bold

Reactivo	Stock
Na ₂ EDTA-2 H ₂ O	0.75 g/L H ₂ O
FeCl ₃ -6 H ₂ O	.097 g/L H ₂ O
MnCl ₂ -4 H ₂ O	.041 g/L H ₂ O
ZnCl ₂	.005 g/L H ₂ O
CoCl ₂ -6 H ₂ O	.002 g/L H ₂ O
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	.004 g/L H ₂ O

Tabla 2 P-IV Solución de Metales

Reactivo	Stock
CaCO ₃	1mg/200ml H ₂ O

Tabla 3 Solución Soliwater

Se realizaron recuentos cada 48 horas en cámara Neubauer (.1mm Tiefe Depth Profondeup), por triplicado obteniendo cinéticas de crecimiento. Para el cálculo de crecimiento se empleó una ecuación consultada en la bibliografía [7].

$$Nb = (\Sigma \text{Cel. Cb}) / 4 * 10000 \quad (1)$$

Donde:

Na y Nb= Número de células por mL (cel/mL).

Σ Cel. Ca= Suma de células en la diagonal central de la cámara Neubauer.

Σ Cel. Cb= Suma de células en 4 cuadrantes externos de la cámara Neubauer.

Recuperación de biomasa

La biomasa microalga (peso seco) se obtuvo a través de centrifugación a 4000 rpm., durante 10 min. (Centrifugadora UNICO C8704x) separando el sobrenadante de las microalgas en caja Petri, previamente pesada, se terminó su proceso de secado en un horno a 40°C durante 24 horas. La concentración celular puede variar de acuerdo a la velocidad x.

Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se realizó por medio del equipo soxhlet usando como solvente hexano en las cepas *Chlorella protothecoides* y *Scenedesmus Sp*, repitiendo de recirculación durante 24 horas. Se empleó biomasa microalgal pulverizada recolectada de las cepas. Posteriormente a la extracción de lípidos se usó un rota-vapor para separar el hexano empleado.

Se pesó la muestra de grasa seca obtenida y se determinó el porcentaje de grasa microalgal obtenida. Para el cálculo del porcentaje de grasa se empleó una ecuación consultada en la bibliografía [7].

$$\%G = \frac{T_2 - T_1}{w} \times 100\% \quad (2)$$

Donde:

$\%G$ = Porcentaje de grasa en muestra seca
 T_2 = Peso del matraz bola con la grasa seca (mg)
 T_1 = Peso del matraz bola vacío.
 w = Peso de la muestra en miligramos (biomasa microalgas).

La evaluación de la composición de ácidos grasos se realizó por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama, previa derivatización como Metil Ésteres [CINVESTAV. Cd. De México].

Síntesis Biodiesel a través de método de ultrasonido

El aceite obtenido se calentó en el ultrasonido que funciona a una frecuencia de 40 KHz y una potencia de 70W a una temperatura de 60° C, posteriormente se mezcla con una solución hecha de metanol (relación molar de lípido: metanol 1:9) y catalizados de KOH (aceite de 9% en peso).

El proceso de transesterificación se realizó durante 3 hora a 60° C. Se mantuvo en reposo el experimento durante 24 horas donde se observó la separación de fases.

Resultados

En el grafico 1 se observa el crecimiento de *Chlorella protothecoides* adquiriendo un mayor crecimiento en los experimentos durante los días 8-10 llegando a su fase exponencial. En particular el experimento con medio BB, con adición de CO₂ proveniente de la fermentación presento 90.0x10⁶ cel. /mL, mientras que el medio BB con adición de CO₂ del medio ambiente solo presenta 25.83x10⁶ cel. /mL, esto se debe que a concentraciones más altas de CO₂ permite que el proceso de reproducción sea mayor.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Fan et al. [3], donde un cambio en las condiciones del cultivo trae consigo cambios en las fases de adaptación y crecimiento exponencial.

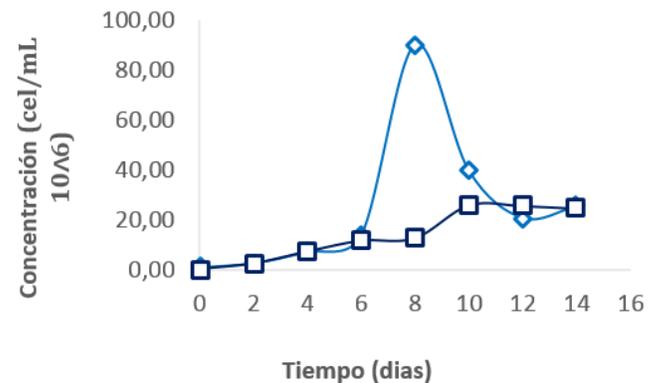


Grafico 2 Crecimiento celular de la microalga *Chlorella protothecoides* en medio BB. \diamond Con adición de CO₂ y N, Sin adición de CO₂ y con N

En el grafico 2 se muestra el crecimiento de la microalga *Scenedesmus Sp.*, mostrando que durante los días 8-10 llega a su fase exponencial en particular el experimento con medio BB, con adición de CO₂ proveniente de la fermentación obteniendo 73.20x10⁶ cel. /mL, mientras que el medio BB con adición de CO₂ del medio ambiente solo presenta 48.6 x10⁶ cel. /mL.

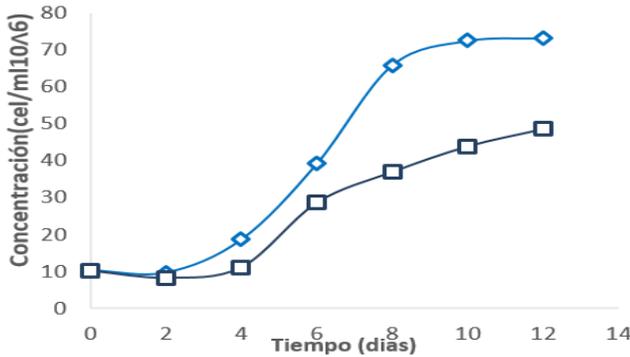


Grafico 2 Crecimiento celular de la microalga *Scenedesmus Sp* en medio BB y medio BB limitado. ◇ Con adición de CO₂ y N, □ Sin adición de CO₂ y con N

En el grafico 3 se puede observar la concentración de peso seco, mostrando mayores concentraciones en el MBB, esto se debe que en condiciones estándar la microalga se adapta con mayor velocidad aumentando su peso.

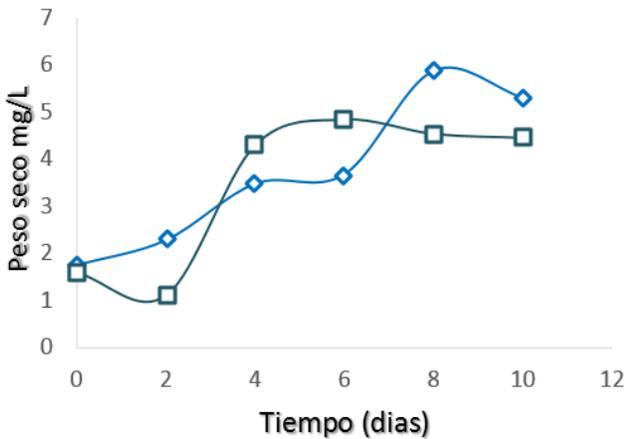


Grafico 3 Peso seco de la microalga *Scenedesmus Sp* en medio BB y medio BB limitado. Con adición de CO₂ y N, Sin adición de CO₂ y con N

En el grafico 4 se aprecia la concentración de peso seco mostrando resultados favorables en el medio de cultivo BB, que contiene CO₂ del ambiente, a razón de que al mantener la cepa en condiciones de cultivo normales su adaptación es más rápida, por lo tanto refleja mayor índice de peso seco.

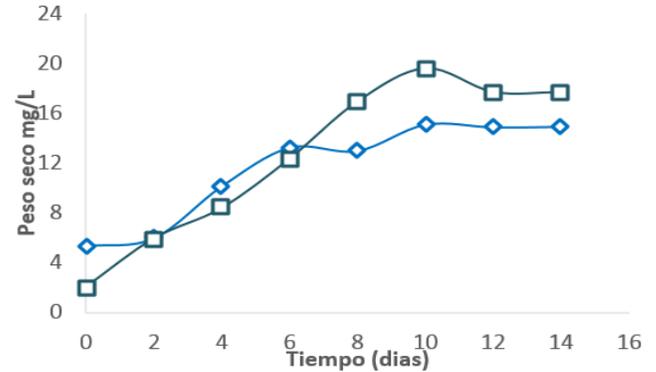


Grafico 4 Peso seco de la microalga *Chlorella protothecoides* en medio BB. ◇ Con adición de CO₂ y N, □ Sin adición de CO₂ y con N

En la tabla 4 se muestra la composición de ácidos grasos extraída la cepa *Chlorella protothecoides*, se muestra que al adicionar CO₂ del medio ambiente en combinación con el CO₂ de la fermentación alcohólica proveniente del ambiente muestran porcentajes mayores de ácido palmítico y oleico siendo ácidos grasos de saturación mejorando las propiedades del biocombustible (poder calorífico, estabilidad oxidativa) [4].

Composición de ácidos grasos		
Muestra	CO ₂ de la fermentación en medio BB 90.1mg	CO ₂ del ambiente en medio BB 68.5 mg
Ácidos Grasos	%	%
Laurico	0.22	-----
Tidecanoico	0.21	-----
Miristoleico	0.45	1.26
Palmítico	7.95	6.65
Cis-10-Heptadecanoico	0.88	-----
Estearico	3.6	2.63
Oleico	10.83	10.07
Linoleico	25.15	6.66
α-Linolénico	12.83	6.47

Cis-11,14-Eicosadienoico	-----	23.12
Behenico	1.05	-----

Tabla 4 Composición de ácidos grasos de *Chlorella protothecoides*

Agradecimiento

Se agradece al CONACYT por el proyecto otorgado “Generación de fuentes alternas de energía: bioetanol, biohidrógeno y biodiesel, año 3”.

Conclusiones

De acuerdo a los experimentos realizados si se adiciona carbono proveniente de la fermentación alcohólica (CO₂) aumenta el crecimiento de las microalgas comparado con el CO₂ que logran captar del medio ambiente, cotejando el crecimiento de ambas cepas se reportó un mayor crecimiento en *Chlorella protothecoides* con 90.0x10⁶ cel. /mL mientras que en *Scenedesmus Sp* se reportó 73.20x10⁶ cel. /mL. Ambos experimentos llegaron a su fase exponencial entre los días 8-10.

Al evaluar el peso seco se mostró una mayor concentración en *Chlorella protothecoides* que en *Scenedesmus Sp*, sin embargo cuando se alteran algunas condiciones, la ruta metabólica de la microalga cambia, viendo esto reflejado en el experimento con presencia de CO₂ captado del medio ambiente en medio BB, posee una mayor concentración de peso seco a razón que el microorganismo no fue privado de ninguna condición entonces el proceso de adaptación es más acelerado. De la evaluación de ácidos grasos por cromatografía de gases se encontró un mayor porcentaje de ácido Linoleico y α -Linolenico en condiciones de adición de CO₂ proveniente de la fermentación alcohólica comparado con la adición de CO₂ proveniente del ambiente.

Referencias

- [1]. Garibay A., Velazquez R. (2009). Biodiesel a Partir de Microalgas. *BioTecnología*, .13 (3):
- [2]. Chisti Y (2007). Biodiesel from microalgae – a review. *Biotechnol. Adv.* 1 (25): 294–306.
- [3]. Barajas A, Godoy C. y Morroy D. (2012). Improvement of CO₂ sequestration by *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 on lab scale photobioreactors. *rev.ion*, 25(2):39-47, (2012)
- [4]. Brennan, L. y Owende P.(2010). “Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577, 2010.
- [5]. Angel D. González 1, Dr. Viatcheslav K., Dr. Guzmán A. (2009). Of methods of extraction of oil in the production line of biodiesel from microalgae. *Prospect.* 7 (2): 53-60
- [6]. Plata V., Dr. Kafarov V, Dr. Moreno N. Development of a methodology of transesterification of oil in the production line of biodiesel from microalgae. *Prospect.* 7 (2): 35-41 (2009)
- [7]. Aguilar C., Chang I., Tenorio L., Ynga G. (2007). Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible.FINCYT – PIBAP (2007)
- [8]. Tacias V., Rosales A., torrestiana B. (2016). Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiesel: un caso de estudio. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 32 (3) 303-313

- [8]. Sharif H., Aischah S., Partha C., Mohd N. (2008) American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (3):250-254
- [9]. Hwan Y., Sung M., You-Kwab O., Jong-in H. (2015). Lipid extraction and esterification for microalgae-based biodiesel production using pyrite (FeS₂). Bioresource Technology 0960-8524
- [10]. Bousquet O., Sellier N., Le Goffic F. (1994). Characterization and Purification of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Countercurrent Chromatography. Chromatographia Vol. 39, No. 1/2
- [11]. Syed H., Iftikhar A., Qaisar M., Arshid P.. (2016). Improvement in lipids extraction processes for biodiesel production from wet microalgal pellets grown on diammonium phosphate and sodium bicarbonate combinations. Bioresource Technology 214 199–209.
- [12]. Tejada L., Hernao D., Alvear M., Castillo C. (2015). Characterization and lipid profile of oil from microalgae. Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.) Vol. 24. No. 39. pp. 43-54
- [13]. Castellar G., Angulo E.R., Cardozo B.M. , (2014). “Transesterification vegetable oils using Heterogeneous catalysts”, Prospect, Vol 12, N° 2, 90-104.
- [14]. Kwangdinata R., Raya I., Zakir M. (2014). Producción de Biodiesel a partir de lípidos de fitoplancton *Chaetoceros calcitrans* a través método ultrasónico ScientificWorldJournal 231.361
- [15]. Cavonius L.R., Carlsson N. (2014). La cuantificación de los ácidos grasos totales en microalgas: comparación de métodos de extracción y de transesterificación. Anal Bioanal Chem. 406 (28): 7313 a 7.322.
- [16] Fuentes M., Aranda M., Gomez S. (2016). Ultrasonic waves applicates in biodiesel produced with differents vegetables oils. Instituto de investigacion, FIGGMG-UNMSM 19(38):147-151.
- [17] Jungmin K., Byung-Gon R., Kyochan K., Bo-Kyong K., Jong-In H., Ji-Won Yang. (2012). Continuous microalgae recovery using electrolysis: Effect of different electrode pairs and timing of polarity exchange. Bioresource Technology 123: 164-170