

## Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas

### Biodiesel production from microalgae: progress and biotechnological prospects

Omar S. Castillo, Sandra G. Torres-Badajoz, Carlos A. Núñez-Colín, Vicente Peña-Caballero, Carlos H. Herrera Méndez y Jesús R. Rodríguez-Núñez

Programa de Biotecnología, Universidad de Guanajuato. Mutualismo #303, Colonia La Suiza, Celaya, Guanajuato, 38060, México  
e-mail: [jesus.rodriguez@ugto.mx](mailto:jesus.rodriguez@ugto.mx)

**Recibido:** 25 de mayo de 2016.

**Aceptado:** 8 de noviembre de 2017.

Castillo, O. S., S. G. Torres-Badajoz, C. A. Núñez-Colín, V. Peña-Caballero, C. H. Herrera Méndez y J. R. Rodríguez-Núñez. 2017. Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica* 27 (3): 337-352. DOI: 10.24275/uam/izt/dcb/hidro/2017v27n3/Rodríguez

#### RESUMEN

**Antecedentes.** Las microalgas son una alternativa para la obtención de biodiésel por su alto rendimiento de lípidos y su perfil de ácidos grasos. **Objetivos.** Hacer una revisión sobre los avances y perspectivas actuales de la producción de biodiésel a partir de microalgas. **Métodos.** Se realizó una búsqueda actualizada de los trabajos de investigación relacionados con la producción de biodiésel a partir de microalgas, con especial énfasis en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, la producción de biomasa, las técnicas de extracción, los procesos biotecnológicos implementados en sistemas de cultivo, la transesterificación y los sistemas de doble propósito. **Resultados.** Las microalgas tienen rendimientos altos de producción de lípidos ( $59 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), por lo que representa una alternativa para la obtención de biodiésel; sin embargo, el costo de producción y recuperación de biomasa sigue siendo elevado ( $\$5.8 \text{ USD Kg}^{-1}$ ), aunado a los altos requerimientos energéticos ( $33 \text{ MJ Kg}^{-1}$ ). Actualmente no existen técnicas industriales factibles para la extracción de lípidos y se están probando los métodos por fluidos supercríticos, campo eléctrico de pulso, microondas y ultrasonificación. La biotecnología ha propuesto un novedoso sistema biológico mediante el uso de lipasas recuperadas de hongos filamentosos para el proceso de transesterificación, los cuales ya son comerciales, y ha logrado rendimientos de biocatálisis mayores al 90%. Los “sistema de doble propósito” pueden ser optimizados utilizando un diseño modular que establezca los procesos y operaciones unitarias bien definidas. **Conclusiones.** El uso de microalgas para la obtención de biodiésel representa una técnica viable gracias a su alto contenido lipídico y a su perfil de ácidos grasos, aunque hace falta el desarrollo de tecnologías que disminuyan el costo de producción. El uso de sistemas de doble propósito se vislumbra como una buena opción para reducir estos precios, al mismo tiempo que se reusan aguas residuales.

**Palabras clave:** Biomasa, lipasas, PUFAs, transesterificación.

#### ABSTRACT

**Background.** Microalgae have proven to be an excellent alternative to produce biodiesel due of its high lipid yield and its fatty acid profile. **Goals.** A review was made on the current advances and perspectives on the production of biodiesel from microalgae. **Methods.** An updated search was done of the research work related to biodiesel production from microalgae, emphasizing fatty acid and triglyceride biosynthesis, biomass production, extraction techniques, biotechnological processes implemented in culture systems, transesterification and dual purpose systems. **Results.** Microalgae have shown high yields of lipid production ( $59 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ ) representing an alternative to produce biodiesel. However, costs of biomass production and recovery remain high ( $\text{US } \$ 5.8 \text{ kg}^{-1}$ ), coupled with high-energy requirements ( $33 \text{ MJ kg}^{-1}$ ). Supercritical fluids, electric pulse field, microwave and ultra sonication have being tested for lipid extraction, but currently there are no feasible industrial techniques in this field. Biotechnology has proposed a novel biological system through the use of lipases recovered from filamentous fungi for the transesterification process, which are already commercial, achieving biocatalysts' yields greater than 90%. In order to optimize the dual-purpose system, it is viable to use a modular design that establishes well-defined processes and unit operations. **Conclusions.** The use of microalgae to obtain biodiesel represents a viable alternative due to its high lipid content and its fatty acid profile, although it is necessary to develop technologies to reduce costs of production. An alternative could be to use dual-purpose systems is foreseen as a goo, and re-using wastewater.

**Key words:** Biomass, lipases, PUFAs, transesterification.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de combustibles alternativos y de bajo impacto ambiental es cada vez más importante debido a factores económicos y medioambientales. La naturaleza no renovable de las reservas de combustibles fósiles y el cambio climático han suscitado preocupaciones sobre la seguridad energética, generando interés en la utilización de energías renovables como los biocombustibles (Acosta *et al.*, 2009). Estudios previos han demostrado la capacidad de algunos alimentos (aceite de soya y palma) para la producción de biodiésel, sin embargo, existe el debate sobre la factibilidad de utilizarlos para la obtención de energía, ya que podría ser una competencia directa con el uso de recursos para alimentación humana y animal. En este sentido, en México la Ley de Promoción y Desarrollo de Bioenergéticos establece las normas en temas de producción y comercialización de insumos y permisos para el uso de maíz en los bioenergéticos.

El biodiésel ha surgido como una alternativa viable para sustituir el diésel derivado del petróleo (Taher *et al.*, 2014), puesto que presenta varias ventajas por su biodegradabilidad y mínima toxicidad, además, su combustión produce menores emisiones de sulfatos, compuestos aromáticos, dióxido de carbono, monóxido de carbono, humo; hay más oxígeno libre que conduce a una combustión completa y emisiones reducidas (Atabani *et al.*, 2012).

En un estudio realizado en el 2006 por la Secretaría de Energía (SENER) de México se menciona que la producción de biodiésel a escala comercial puede ser factible a mediano plazo si se llevan a cabo acciones integrales, que incluyan aspectos técnicos, económicos y medioambientales con el sector agrario y agroindustrial, conjuntando esfuerzos en investigación y desarrollo tecnológico. Aca-Aca *et al.* (2009) aluden que México requiere 10 plantas industriales con capacidad de 100,000 ton/año cada una, sólo para sustituir el 5% del diésel de petróleo usado cada año y recomiendan que la producción y el procesamiento se realicen con tecnologías diseñadas y construidas en el propio país. Taher *et al.* (2014) argumentan que el uso de biodiésel reduciría en un 45% las emisiones de hidrocarburos, 47% de CO<sub>2</sub> y hasta un 66% las emisiones de partículas al ambiente.

En este sentido, los ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable (aceites vegetales, grasas animales y aceites de microalgas) representan la principal materia prima para la producción de biodiésel líquido obtenido en forma de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol (Robles-Medina *et al.*, 2009). Los procesos más usados para la obtención de biodiésel son la pirólisis y la transesterificación, sin embargo, en el primer caso el método es caro y ofrece rendimientos bajos, mientras que el segundo se presenta como el método más viable para la obtención de biodiésel (Gog *et al.*, 2012). Este proceso de conversión de aceites a biodiésel es necesario debido a que los aceites vegetales o extraídos de microalgas presentan una alta viscosidad y baja volatilidad, causando una combustión incompleta y la disposición de depósitos de carbón (Akho *et al.*, 2007).

La obtención de biodiésel a partir de microalgas lleva más de 20 años de investigación y, en la última década, este tema ha retomado vital importancia, especialmente en los sectores privados y académicos. Actualmente, investigadores de todo el mundo han demostrado el potencial de varias especies de microalgas (p. ej. *Chlorella minutissima* Fott *et Novakova*, *Thalassiosira fluviatilis* (Grunow) G. Fryxell *et Hasle*, *Thalassiosira pseudonana* Hasle *et Heimdal*, etc.) como materia prima para producir biodiésel; no obstante, los costos de producción no han

resultado competitivos en comparación con los obtenidos de recursos fósiles (\$0.55 USD/L) (Dalmás-Neto *et al.*, 2014; Guldhe *et al.*, 2016). A pesar de estos retos, las microalgas son consideradas actualmente como una de las alternativas ingenieriles para la obtención de biodiésel por a su alto contenido de lípidos y aceites (1 a 90% base seca, dependiendo de la especie y condiciones de cultivo), además de presentar una rápida producción de biomasa en comparación con otros cultivos energéticos (Mathimani *et al.*, 2015; Sibi *et al.*, 2015) y su huella ecológica es mínima en un análisis de ciclo de vida (Atabani *et al.*, 2012). Adicionalmente, las microalgas pueden reducir la cantidad de gases de efecto invernadero y consumir otros contaminantes (Halim *et al.*, 2012). El objetivo del presente trabajo fue revisar la situación actual del uso de microalgas para la producción de biodiésel, incluyendo métodos de procesamiento, especies más utilizadas y sus principales ventajas en comparación con otros biocombustibles. De igual manera, se hace un análisis de los avances biotecnológicos actuales en este campo.

## MICROALGAS COMO FUENTE DE BIODIÉSEL: AVANCES Y PERSPECTIVAS

Las microalgas son microorganismos unicelulares, se clasifican como procariontas y eucariotas. Se dividen en diferentes grupos en función de su taxonomía, incluyendo azul-verde, verde, verde-amarillo, rojo, marrón y las algas de oro. Hay más de 50.000 especies de microalgas (Rashid *et al.*, 2014).

El empleo de microalgas para la producción de biodiésel es una alternativa viable por su elevado contenido de lípidos y su perfil idóneo para la obtención de éste. Aunado a lo anterior, otros atributos de las microalgas son su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces y residuales, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta (Garibay *et al.*, 2009). Las microalgas pueden mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> y producir lípidos, por lo que se consideran con potencial para la obtención de biocombustibles de tercera generación (Arias *et al.*, 2013).

Es importante el estudio de factores, tales como el aislamiento de especies de microalgas, el mecanismo metabólico, las condiciones de cultivo y el modo de operación y el diseño del fotobiorreactor, ya que son aspectos determinantes para mejorar el desarrollo del biocombustible (Zhu *et al.*, 2013).

También se debe desarrollar un proceso sustentable de producción de biodiésel a partir de microalgas, que sea técnica y económicamente viable, donde se haya realizado la optimización de medios de cultivo, selección, manipulación de cepas y el diseño adecuado de fotobiorreactores (Arudchelvam & Nirmalakhandan, 2013). Además, se debe considerar el proceso de recuperación de biomasa, extracción de aceites, subproductos, tecnología de transesterificación, purificación y uso de subproductos (Dai *et al.*, 2014).

El uso de microalgas cultivadas para la obtención de lípidos ha demostrado un alto rendimiento 59 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Lee *et al.*, 2012), lo cual la convierte en una fuente potencial para la obtención de biodiésel. La gran mayoría de las especies conocidas de microalgas acumulan sus ácidos grasos, triglicéridos y glicolípidos de forma intracelular, con excepción de *Botryococcus braunii* Kuetzing, esto involucra procesos de extracción de lípidos que encarecen la producción de biodiésel (Lee *et al.*, 2012). En cálculos recientes se estima que el costo de producción de biomasa de microalgas es elevado, alrededor de \$5.8 USD Kg<sup>-1</sup>, y

a su vez también son altos los requerimientos energéticos (33 MJ Kg<sup>-1</sup> de biomasa seca) para la recuperación de los lípidos intracelulares. En contraparte, por ejemplo, el aceite de canola está disponible por un monto de \$1.25 USD Kg<sup>-1</sup>, lo que demuestra que actualmente los precios del aceite extraído de microalgas no son competitivos para la obtención de biodiésel (Slade & Bauen, 2013).

La selección de microalga es el primer paso en el desarrollo de un proceso de producción, éstas deben tener las características adecuadas para las condiciones de cultivo específicas, con el fin de conseguir un determinado producto (Jaimes-Duarte *et al.*, 2012). En la tabla 1 se presenta el porcentaje en peso de lípidos de algunas microalgas, así como su productividad en lípidos y biomasa.

En este sentido, Slade & Bauen (2013) mencionan que los costos de la producción de biomasa microalgal se pueden reducir cultivando las microalgas en lagunas abiertas, puesto que los gastos que se requieren para la operación del sistema (mantenimiento y materias primas) son menores, en comparación al cultivo en fotobiorreactores, principalmente por la inversión para la compra del sistema. Señalan que otro aspecto que reduce significativamente el precio de producción (>50%) es bajar los costos del CO<sub>2</sub>, agua y nutrientes. La optimización y diseño de equipos para el procesamiento postcultivo también representa un ahorro significativo para la obtención de biodiésel a partir de microalgas. Bagchi *et al.* (2015) destacan que el proceso de secado representa hasta un 30% del costo total, por eso diseñaron un horno de secado que ahorra el 50% (0.017 kWh) de la energía generalmente usada en este proceso.

Alva *et al.* (2013) sostienen que el uso de aguas residuales municipales para la producción de biomasa microalgal ofrece una alternativa viable para disminuir los costos de producción de lípidos debido al ahorro de agua y nutrientes (ej. N, P, K), estos últimos se pueden controlar mediante diluciones y si son necesarias concentraciones mayores se pueden suplementar con sales de bajo costo u otros efluentes anaerobios ricos en estos nutrientes (ej. N y P). Esta alternativa contribuye en la recuperación de nutrientes presentes en aguas residuales.

Existen otros estudios que han buscado soluciones para reducir costos en el cultivo de microalgas utilizando fuentes alternativas de carbono y otros nutrientes. En este sentido, Tripathi *et al.* (2015) informaron que la búsqueda nuevas especies con capacidad de fijar altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (15%) o utilizar el carbono presente en las rocas (como el mármol) representa un potencial para la obtención de biomasa microalgal útil para la formulación de biodiésel con menores costos. Rattanapoltee & Kaewkanetra (2014) apuntan que el uso de sacarosa en bajas concentraciones para la acumulación de lípidos en *Chlorella vulgaris* Beijerinck resulta ser el sustrato más económico en relación costo-beneficio. Chi *et al.* (2016) indican que el costo del nitrógeno requerido para el crecimiento microalgal debe ser considerado en los procesos de escalamiento para la producción de biodiésel. Estos autores reportaron un 66.5% de acumulación de lípidos en *Isochrysis zhangjiangensis* Hu *et al.* Liu y una productividad de lípidos de 3.28 g/d por cada gramo de nitrógeno alimentado al cultivo, lo cual consideran un uso eficiente del nitrógeno.

Tabla 1. Porcentaje lipídico y productividad de biomasa y lípidos de distintas microalgas.

Especie	Lípidos acumulados (%)	Productividad de biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Productividad de lípidos (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Referencia
<i>Anabaena variabilis</i> Kützing ex Bornet & Flahault	46.9	0.1156	0.0542	Han <i>et al.</i> (2016)
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Corda) Ralfs	59.6	0.1246	0.074	Singh <i>et al.</i> (2015)
<i>Chaetoceros muelleri</i> Lemmerman	43.4	0.272	---	Wang <i>et al.</i> (2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> P. A. Dangeard	25.25	2.0	0.505	Kong <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlamydomonas</i> sp.	33.1	---	0.169	Nakanishi <i>et al.</i> (2014)
<i>Chlorella sorokiniana</i> Shihira <i>et al.</i> R. W. Krauss	31.5	12.2	2.9	Li <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella minutissima</i> Fott <i>et al.</i> Nováková (UTEX2341)	62.97	1.78	0.29	Li <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> H. Chick	24.25	0.144	0.02685	Tang <i>et al.</i> , 2011
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> (Krüger) Kalina <i>et al.</i> Puncochárová (= <i>Chlorella protothecoides</i> Krüger)	51.5	---	1.19	Mu <i>et al.</i> (2015)
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck [Beijerinck]	22.8	0.0848	0.01043	Frumento <i>et al.</i> (2013)
<i>Chromochloris zofingiensis</i> (Dönn) Fucíková <i>et al.</i> L. A. Lewis (= <i>Chlorella zofingiensis</i> Dönn)	54.5	.0584	0.0223	Feng <i>et al.</i> (2011)
<i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchner) E. Hegewald	---	0.27008	0.06708	Xia <i>et al.</i> (2014)
<i>Dunaliella tertiolecta</i> Butcher	11.44	0.42	0.0164	Sidney <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i> (Droop) D. J. Hibberd	50.4	0.497	0.151	Şirin <i>et al.</i> (2015)
<i>Neochloris oleoabundans</i> S. Chantanachat <i>et al.</i> Bold	29	0.98	0.1124	Santos <i>et al.</i> (2013)
<i>Tetrademus obliquus</i> (Turpin) M. J. Wynne (= <i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing)	49.6	0.45-0.55	0.151-0.193	Feng <i>et al.</i> (2014)
<i>Scenedesmus</i> sp.	16.6	0.174	0.0195	Taher <i>et al.</i> (2014)
<i>Tetraselmis</i> sp.	30.5	0.13	0.047	Kim <i>et al.</i> (2016)

## BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS Y TRIGLICÉRIDOS EN MICROALGAS

Las rutas metabólicas sobre la biosíntesis de lípidos de microalgas son un campo todavía por explorar en comparación con el metabolismo de las plantas. Sin embargo, se cree que las rutas metabólicas seguidas son similares (Yu *et al.*, 2011). La síntesis de ácidos grasos en las algas se realiza en los cloroplastos y generalmente se producen cadenas de ácidos grasos de 16C y 18C, los cuales son usados por la célula para la síntesis de membranas, triglicéridos, almacenamiento de lípidos neutros y cloroplastos. Específicamente, la biosíntesis de ácidos grasos se inicia con la conversión del Acetil-CoA a Malonil-CoA catalizada por la enzima Acetil-CoA Carboxilasa (ACCasa). La molécula de Malonil-CoA es la donadora de carbono para la síntesis de nuevos ácidos grasos, donde es transferida de la CoA a un cofactor proteico (ACP) para la obtención del Malonil-ACP, el cual participa en una serie de reacciones de condensación con los aceptores acil-ACP y acetil-CoA. El ciclo termina cuando el grupo acil es removido del sitio ACP por la acil-ACP tioesterasa y una vez sintetizados los ácidos grasos libres son transportados del ACP al glicerol-3-fosfato o al monoacilglicerol-3-fosfato (Ohlogge & Browse, 1995). La ruta metabólica se muestra en la Figura 1.

Así mismo, la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) a base de microalgas marinas o de agua dulce es de vital importancia para la elaboración de biodiésel o como aditivos alimentarios. Las microalgas tienen mayor capacidad para sintetizar y almacenar PUFAs de cadena larga >18C (ácido eicosapentanoico (EPA), C20:5 $\omega$ 3, ácido docosahexanoico (DHA), C22:6  $\omega$ 3 y ácido araquidónico, C20:4  $\omega$ 6) (Harwood & Guschina, 2009). De igual forma, Guschina & Harwood (2006) mencionan que existen principalmente dos rutas metabólicas para la síntesis de EPA denominadas  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 aunque la  $\omega$ -6 es la ruta más usada. En la ruta  $\omega$ -6 el ácido linoleico es desaturado para la obtención de ácido  $\gamma$ -linolénico, después es elongado para conseguir el ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico y su posterior desaturación para producir el ácido araquidónico y finalmente el EPA. En la ruta  $\omega$ -3 el ácido linoleico es desaturado, lo que resulta en el ácido  $\alpha$ -linolénico, para enseguida ser desaturado y generar el ácido estearidónico, a continuación, se realiza una elongación y se obtiene el ácido eicosatetraenoico y finalmente su conversión a EPA. Las rutas biosintéticas para el resto de los ácidos grasos se muestran en la Figura 2, ahí las desaturaciones se abreviaron con D y el número adjunto muestra el sitio de reacción (E, elongación; PKS policétido sintasa). Las líneas punteadas indican reacciones que no han sido descritas completamente.

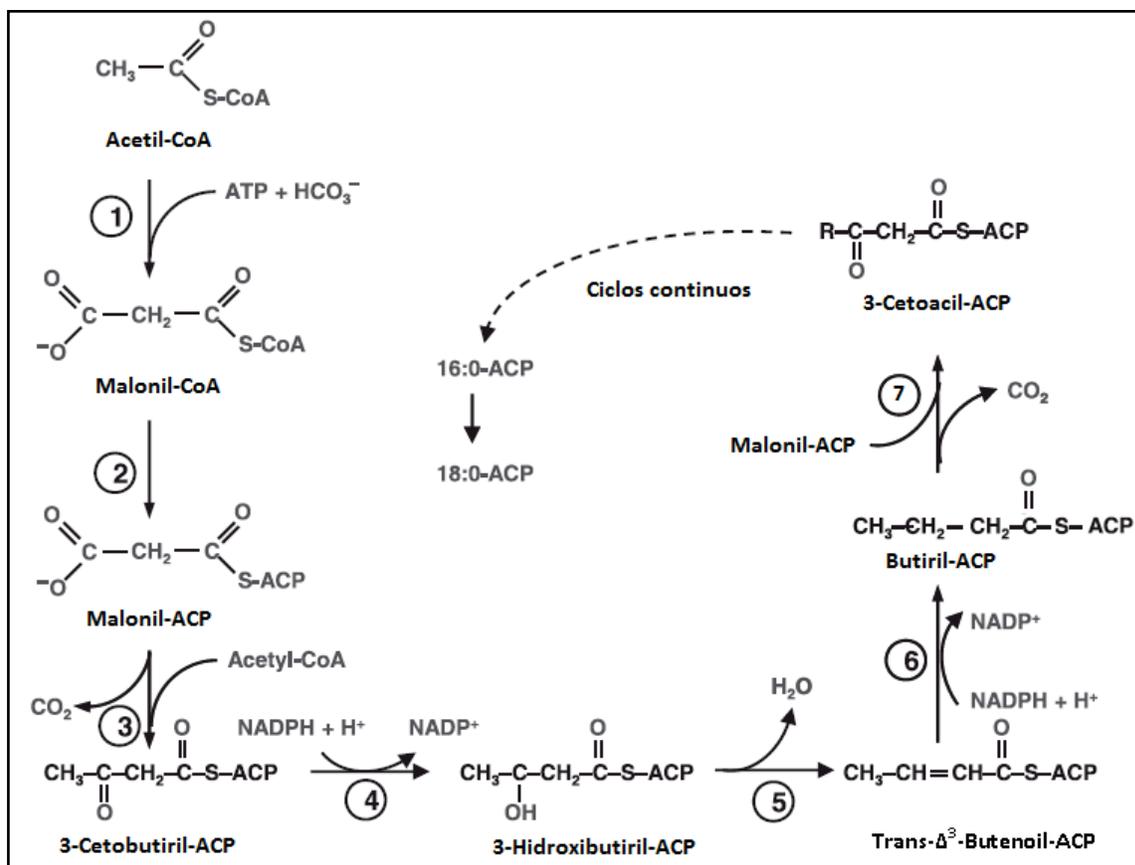


Figura 1. Bioquímica de síntesis de lípidos por microalgas. Adaptada de Hernández *et al.*, 2009. \*Reacción 1: El Acetil-CoA entra al ciclo como sustrato para la enzima ACCasa y se obtiene el Malonil-CoA. Reacción 2: es catalizada la conversión de Malonil-CoA a Malonil-ACP por la Malonil-CoA: ACP transferasa (el Malonil-CoA será la molécula donadora de carbón en las siguientes reacciones de elongación). Reacción 3: descarboxilación del Malonil-CoA y la condensación con el Acetil-CoA. Reacción 4: reducción del 3-Cetobutiril-ACP por la 3-cetoacil-ACP reductasa. Reacción 5: deshidratación para la obtención de una insaturación en el carbono  $\alpha$  por la enzima 3-hidroxiacil-ACP deshidrataza. Reacción 6: reducción de la doble ligadura por la enoil-ACP reductasa. Reacción 7: ciclo de elongación (repetición del paso 3 al 6) hasta la obtención de ácidos grasos saturados de 16C o 18C o ambos.

Los triglicéridos son comúnmente encontrados como grasas almacenadas o aceites y pueden ser neutros. Están constituidos de tres ácidos grasos esterificados vía grupos hidroxilos de un grupo glicerol. En la síntesis de triglicéridos las microalgas usan la ruta directa de glicerol (ver Figura 3) (Hu *et al.*, 2008). Específicamente, los ácidos grasos producidos en los cloroplastos secuencialmente son transferidos por la CoA a la posición 1 y 2 del glicerol-3-fosfato, obteniendo el ácido fosfatídico (PA) como metabolito central. La desfosforilación del PA catalizado por la fosfatasa libera diacilglicerol y finalmente un tercer ácido graso es unido a la posición 3 libre del DGA mediante la enzima diacilglicerol aciltransferasa. Además, las moléculas PA y DGA pueden ser usadas directamente en la síntesis de lípidos polares como la fosfatidilcolina (PC) y galactolípidos (Yu *et al.*, 2011).

### TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICROALGAS

El proceso de obtención de biodiésel a partir de microalgas se divide en 3 etapas: 1) cultivo de la cepa para la obtención de biomasa, 2) cosecha de biomasa y disrupción celular y 3) reacción de esterificación para la conversión a biodiésel (Koller *et al.*, 2012).

**Etapa 1: métodos para aumentar la biomasa y lípidos.** Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias apoyadas con técnicas biotecnológicas con el fin de mejorar los rendimientos y reducir contaminantes (p. ej. fitorremediación, biopelículas para filtración, bioadsorbentes). Sin embargo, el alto costo del carbono heterotrófico (p. ej. glucosa) usado como sustrato representa la principal barrera económica para la producción de lípidos a partir de microalgas (Wang *et al.*, 2014).

En este sentido, Mu *et al.* (2015) señalaron que con el uso del bagazo hidrolizado de caña de azúcar para el cultivo de *Chlorella protothecoides* (Krueger) Kalina *et M.* Puncocch en condiciones heterotróficas se alcanzó una concentración de biomasa de 24.01 g/L y una productividad lipídica de 1.19 g/L/d, y suponen que la xilosa y la arabinosa involucradas en el ciclo de las pentosas fosfato pueden estar predominando sobre la ruta de la glucólisis mejorando la acumulación de lípidos. De igual forma, Cho *et al.* (2015) observaron que el uso de mioinositol en medios de cultivo a una concentración de 500 mg/L aumentó un 48% la producción de biomasa y un 30% la acumulación de lípidos en *Dunaliella salina* Ben-Amotz *et Avron*, también se incrementó la producción de ácido linoleico, linolénico y linoleáidico. Por otro lado, Gui *et al.* (2014) aplicaron un tratamiento de hidrólisis ácida a los residuos lignocelulósicos de la planta *Glycyrrhiza uralensis* con el objetivo de generar un sustrato para el cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, lo que incrementó en un 62% el rendimiento de lípidos y biomasa.

Se ha demostrado que mantener a la microalga bajo condiciones de estrés incrementa la acumulación de lípidos, por lo que se han utilizado métodos como limitación de nitrógeno y adición de iones metálicos y sales como EDTA, para inducir las condiciones de estrés (Ren *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). En este sentido, Liu *et al.* (2016) refieren que mediante una continua limitación de nitrógeno en condiciones fotoautótrofas en cultivo por lote, *C. vulgaris* logra un rendimiento máximo de lípidos de 305.71 mg/L/d y una biomasa de 4.61 g/L. Morales-Sánchez *et al.* (2014) reportan que bajo limitación de nitrógeno en condiciones heterotróficas de lote post-alimentado *Neochloris oleoabundans* (S.Chantanachatt *et H.C.Bold*) J. Komarek acumula hasta un 53.8% de lípidos, con una concentración de biomasa de 20.9 g/L y una productividad de 1020 mg/L/d de lípidos. Por su parte, Ren *et al.*

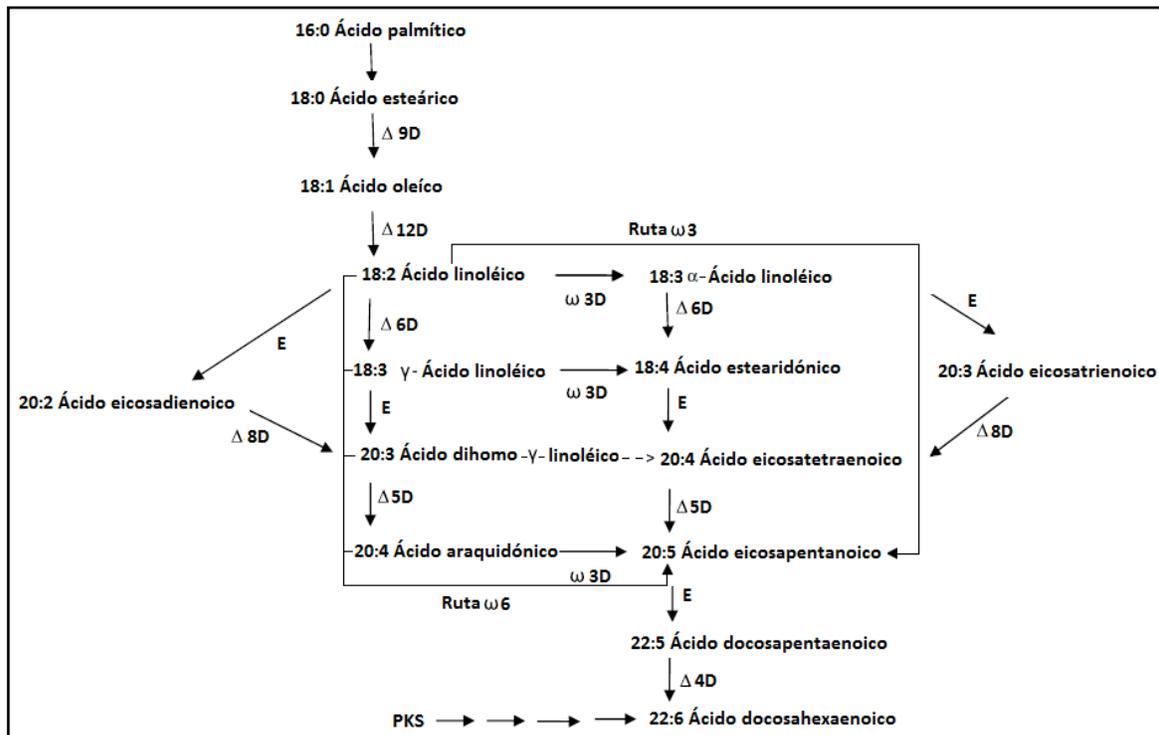


Figura 2. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algas eucariotas. Adaptado de Harwood y Gushina, (2009).

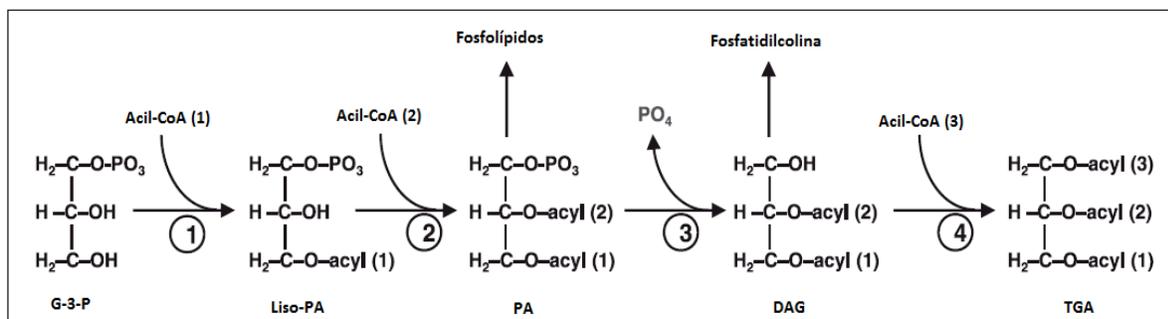


Figura 3. Ruta metabólica de síntesis de triglicéridos en algas. (1) Enzima citosólica glicerol-3-fosfato aciltransferasa, (2) ácido lisofosfatídico aciltransferasa, (3) ácido fosfatídico aciltransferasa, (4) diacilglicerol aciltransferasa.

(2014) evaluaron el efecto de la adición de metales y sales, con lo que lograron un incremento del 28.2% de lípidos, 29.7% (275.7 mg/L/d) en la productividad y 3.49 g/L de biomasa bajo condiciones heterotróficas y mediante la adición de Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y EDTA en *Scenedesmus* sp. De manera general, se considera que la limitación de nitrógeno y el uso de lote alimentado bajo condiciones de estrés nutricional ofrecen los mejores rendimientos de acumulación de lípidos y biomasa en cultivos de microalgas, esto debido a que la falta de nitrógeno reduce la síntesis de proteínas y estimula la formación de lípidos.

El uso de técnicas modernas enfocadas en modificaciones genéticas o la selección de cepas mutadas son algunas de las alternativas para aumentar los rendimientos de lípidos en microalgas y abaratar los costos de producción de biodiésel (Anandarajah *et al.*, 2012; La Russa *et al.*, 2012). Investigaciones previas demostraron que las mutaciones de los 3 tipos de genes homólogos DGATs tipo-2 (Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa) asociados con la producción de triacilgliceridos no presentan un aumento significativo en la acumulación de lípidos, además, provocan alteraciones en el perfil de los ácidos grasos en *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard (La Russa *et al.*, 2012). Por su parte, Xue *et al.* (2015) realizaron una modificación genética en *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin para mejorar la acumulación de lípidos neutros. La modificación se realizó en la enzima málica, involucrada en el metabolismo del piruvato y fijación de carbono. Los resultados mostraron un incremento del 57.8% en la producción de lípidos, manteniéndose una tasa de crecimiento celular similar a la cepa silvestre. En otra investigación, Zhang *et al.* (2016) bloquearon la enzima β-1-3 gluconasa, con el producto comercial Micafungin, inhibiendo la formación de decrisolaminarina y así fomentar la acumulación de lípidos en *Isochrysis zhangjiangensis*. Con esto lograron obtener un 50% más en el rendimiento de lípidos y una disminución del 10% de carbohidratos.

**Etapas 2: técnicas de extracción de lípidos.** No obstante el potencial biotecnológico que representan las microalgas en la producción de lípidos útiles para generar biodiésel, actualmente no existen métodos a escala industrial factibles para la extracción de lípidos y solamente se han reportado nuevos métodos para su uso a escala laboratorio (Neto *et al.* 2013). Entre los métodos más utilizados para la extracción de lípidos de microalgas están el uso de solventes, fluidos supercríticos, campo eléctrico de pulso, microondas y ultrasonificación (Batista *et al.*, 2016; Taher *et al.*, 2014). En este sentido, el enfoque actual es desarrollar o mejorar los métodos de ruptura celular para disminuir el uso de solventes, producir menos residuos, aumentar los rendimientos y mejorar la calidad del producto final (preservar los PUFAs) (Hidalgo *et al.*, 2016).

La sonicación asistida es uno de los métodos físicos más atractivos para romper células y facilitar la extracción de lípidos de microalgas. Una investigación realizada por Suarsini y Subandi (2011) indica que la ultrasonificación presenta mejores rendimientos de extracción en comparación con el método de Soxhlet y maceración y aparte reduce los tiempos. Neto *et al.* (2013), por su parte, notificaron que la ultrasonificación asistida logra una extracción de lípidos del 40.3 y 39.5% en *Thalassiosira fluviatilis* y *Thalassiosira pseudonana*, respectivamente. Otro de los métodos recientemente más estudiados es el uso de fluidos supercríticos, donde en investigaciones como la de Nobre *et al.* (2013) emplean fluidos supercríticos para la extracción de lípidos y pigmentos de *Nannochloropsis* sp. En su investigación señalan que el uso de etanol como cosolvente y CO<sub>2</sub> supercrítico mejora los rendimientos de extracción, alcanzando los 45 g<sub>lípidos</sub>/100 g<sub>biomasa seca</sub> de lípidos y 70% de los pigmentos, también demostraron que la masa remanente puede utilizarse para la producción de biohidrógeno mediante una fermentación con *Enterobacter aerogenes* Hormaeche *et Edwards*. Esta tecnología también ha sido aplicada en la extracción de ácidos grasos esenciales a partir de *C. protothecoides*, *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Hegewald *et Hanagata* y *Nannochloropsis salina* D. J. Hibberd, logrando la recuperación selectiva del ácido α-linolénico y ácidos grasos ω-3 en proporciones similares para las tres microalgas, con rendimientos de extracción de lípidos del orden del 18.15% (Solana *et al.*, 2014).

En relación con el uso de solventes, investigaciones actuales se han enfocado en disminuir su uso y aumentar el rendimiento de extracción. Abomohra *et al.* (2016) resaltan que es de vital importancia optimizar la extracción de ácidos grasos esterificados porque son los únicos que se usan para la producción de biodiésel a partir de microalgas. En este sentido, mencionan que la relación 2:1 de solventes cloroformo: metanol durante 2 h muestran los mejores rendimientos de extracción de ácidos grasos esterificados, sin la necesidad de aplicar procesos de ruptura celular cuando se trabaja con *S. obliquus*. Recomiendan un tratamiento previo con agua caliente por 5 min para inactivar las lipasas y aumentar hasta un 13.7% los rendimientos de extracción de ácidos grasos esterificados. De igual forma, Abomohra *et al.* (2016) mejoraron la extracción de lípidos de *S. obliquus* mediante la optimización de mezclas de solventes y tiempos de extracción aunados a un proceso de ruptura celular. Los resultados muestran que la relación óptima de solventes cloroformo: metanol fue 2:1 con un tiempo de extracción de 2 h sin necesidad de realizar lisis celular para la recuperación de los ácidos grasos esterificados. En otro estudio, Hidalgo *et al.* (2016) ensayaron con mezclas de solventes polares y no polares para

la extracción de lípidos esterificables de *B. braunii* demostrando que la mezcla cloroformo-metanol (75 % v/v metanol) fue la más eficiente, con un 98.9% de rendimiento de extracción de lípidos.

Una de las tecnologías emergentes prometedoras para la extracción de compuestos debido a su bajo costo y bajas temperaturas de operación, es la extracción por presurización cíclica. En esta técnica se utilizan presiones moderadas (<1013 kPa), lo que reduce los costos en comparación con fluidos supercríticos, por ejemplo, e incluso menores que el uso de microondas o sonicación asistida (Ortiz *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2016). Batista *et al.* (2016) aplicaron esta tecnología para la extracción de lípidos de *Chlorella pyrenoidosa* H.Chick, demostrando que con bajos ciclos de presurización (300 s a 91.4 kPa + 300 s a 200 kPa por ciclo) por un tiempo de 7 h, en medio etanólico se alcanza un 72% de remoción de lípidos, con un rendimiento de 11.3% de biomasa. De forma similar, Pieber *et al.* (2012) realizaron la extracción del ácido eicosapentaenoico (EPA) de *Nannochloropsis oculata* Droop con fluidos presurizados y los resultados mostraron que el metanol fue el mejor solvente, comparado con el n-hexano, obteniendo un rendimiento del  $16.7 \pm 6\%$  y  $3.7 \pm 0.1\%$  de ácidos grasos totales y EPA, respectivamente.

Otro de los métodos novedosos es el uso de pulsos eléctricos para la lisis celular y realizar extracciones *in situ*. Flisar *et al.* (2014) probaron un prototipo de generador de pulsos para la extracción de lípidos de microalgas y reportan un 22% de extracción de lípidos. Sin embargo, atribuyen que los rendimientos son bajos debido a problemas de recuperación y cuantificación de lípidos, ya que la ruptura celular se realizó directamente en el reactor. En otras investigaciones similares, como la de Seo *et al.* (2015) desarrollaron un método para romper la célula y extraer los lípidos usando UV en conjunto con la reacción de Fenton logrando una eficiencia de remoción del 85% con bajas concentraciones de  $H_2O_2$  (0.3%).

**Etapas 3: métodos químicos usados en la reacción de transesterificación.** La reacción de transesterificación es uno de los métodos más estudiados y por lo tanto más utilizados en la producción de biodiésel. En este proceso se da la transferencia de un grupo acilo, que puede suceder entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y otro éster (interesterificación) o entre un éster y un alcohol (alcoholólisis) (Freire *et al.*, 2011) (ver Figura 4).

El desarrollo de nuevos catalizadores que mejoren las condiciones de los procesos de esterificación, reduciendo los impactos ambientales y la corrosión que causa el uso de catalizadores convencionales ( $NaOH$ ,  $KOH$  y  $H_2SO_4$ ), representa un reto para la sustentabilidad de los procesos de esterificación (Hwa *et al.*, 2014a). En este sentido, Hwa

*et al.* (2014a) probaron el metóxido de calcio ( $Ca(OCH_3)_2$ ) como catalizador en presencia de metanol y lípidos recuperados de *N. oculata* y señalaron un rendimiento del 92% a 60 °C, siendo este 22% superior al registrado con el catalizador de Mg-Zr. En otro análisis, Hwa *et al.* (2014b) formularon un catalizador mixto de óxido de calcio y magnesio ( $CaMgO$ ) soportado en alúmina ( $Al_2O_3$ ) con el cual se alcanzaron rendimientos del 85.3% de transesterificación y un soporte estable y reusable. Macías-Sánchez *et al.* (2015) aplicaron un método de transesterificación directa de *Nannochloropsis gaditana* L. M. Lubin. El proceso de catálisis lo realizaron con metanol usando como catalizador cloruro de acetilo al 5% a 100 °C durante 105 min, y consiguieron una pureza del 82.7% de ácidos grasos metil-esterificados. De igual forma, Mathimani *et al.* (2015) mencionan que el  $H_2SO_4$  al 3.5% por 2.4 h en presencia de metanol logra los mejores rendimientos para la reacción de metil-esterificación (60%), utilizado *Chlorella* sp. BDUG 91771.

**Métodos biotecnológicos.** Actualmente las lipasas usadas para la producción de biodiésel son obtenidas principalmente de hongos (levaduras y hongos filamentosos) y algunas se encuentran disponibles en el mercado (Novozym 435, Lyposime RM IM, Lypozime TL IM) (Yan *et al.*, 2014). Estas lipasas presentan diversas ventajas, como el poco requerimiento energético, la alta calidad de biodiésel producido y la casi nula generación de residuos (Meng *et al.*, 2014). Aarthy *et al.* (2014) sostienen que es posible aplicar procesos biotecnológicos para realizar una biocatálisis utilizando lipasas de levaduras como *Candida antarctica* (Goto, Sugiyama & Iizuka) Q. M. Wang, Begerow, F. Y. Bai & Boekhout, *C. rugosa* (H.W. Anderson) Diddens & Lodder, *Cryptococcus* sp., *Trichosporum asahii* Akagi ex Sugita, A. Nishikawa & Shinoda y *Yarrowia lypolitica* (Wick., Kurtzman *et Herman*) Van der Walt *et Arx* alcanzado rendimientos de hasta 96% con bajas temperaturas. Por su parte, Aguiaras *et al.* (2015) reportan la obtención de lipasas para la producción de biodiésel de hongos filamentosos como *Rhizomucor miehei* (Cooney *et R. Emers.*) Schipper, *Rhizopus oryzae* Went *et Prins*. Geerl., *Thermomyces lanuginosus* Tsikl, *Aspergillus niger* Tiegh y *Penicillium expansum* Link, y señalan que otra alternativa viable es utilizar las células completas para la biocatálisis.

Guldhe *et al.* (2016) proponen la obtención de biodiésel utilizando lipasas de *A. niger* como biocatalizadores alcanzando, un porcentaje de conversión del 53.76% a 35 °C en presencia de metanol. Sin embargo, estos rendimientos pueden considerarse bajos en comparación con los obtenidos con enzimas comerciales como Novozym 435. En virtud de ello, Navarro-López *et al.* (2015) dieron a conocer la elaboración de biodiésel a partir de *Nannochloropsis gaditana* L. M. Lubin-empleando la enzima comercial Novozym 435 a partir de 4 lipasas. La conversión alcanzada en este caso fue de 94.7% de ácidos grasos metil-esterifi-

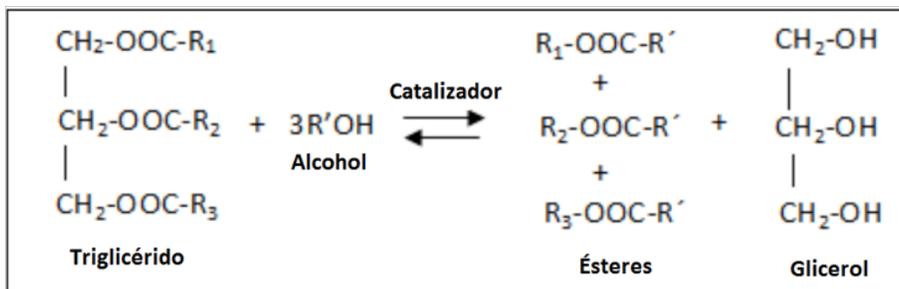


Figura 4. Reacción de transesterificación para la producción de biodiésel.

cados (biodiésel), en un proceso de reacción de 48 h con 10 mL alcohol t-butanol/g de lípidos saponificables (LS), y una relación molar 11:1 metanol/LS. De igual forma, Castillo-López *et al.* (2015), utilizaron Novozym 435 con lipasas de *C. antarctica* logrando un 92.6% de grado de esterificación, produciendo un biodiésel con 83% en peso de pureza a partir de *N. gaditana*. Las condiciones óptimas previamente expuestas se alcanzaron con una relación 1.5:1 (metanol/ácidos grasos libres) y 15:1 (Novozym 435/ácidos grasos libres) a 25 °C durante 4 h. Es posible deducir que la eficiencia de las enzimas comerciales Novozym 435 es similar (mayor al 90%) aun cuando se trabaja con diferentes especies de microalgas y bajo diferentes condiciones de extracción.

A pesar de los altos rendimientos de conversión de biodiésel usando enzimas comerciales, se considera que la producción enzimática de biodiésel a base de microalgas no es factible debido al elevado costo de los procesos de aislamiento, purificación, inmovilización y a la baja estabilidad de las lipasas en medio etanólico (Ognjanovic *et al.*, 2009), de modo que se ha trabajado en el desarrollo de métodos libres de solventes, lo cual evita riesgos de inflamabilidad, toxicidad y reduce el costo por el uso de solventes y procesos de separación, además del desarrollo de soportes para enzimas económicos y biosustentables, que mejoren el rendimiento de producción de biodiésel (Li *et al.*, 2014).

Surendhiran *et al.* (2014) desarrollaron un método para la obtención de biodiésel a partir de *Chlorella salina* inmovilizando la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jorg.) F. C. Harrison 'MTCC9737' en un soporte a base del gabazo de la caña de azúcar en medio no alcohólico. Los resultados mostraron un 85.2% de rendimiento de biodiésel con una relación 1:12 acetato de metilo/aceite a 40 °C durante 60 h. Duraiarasan *et al.* (2016), por su parte, diseñaron un soporte mediante nanopartículas magnéticas para la extracción y conversión directa de biodiésel a partir de los ácidos grasos obtenidos de *C. salina* Butcher. El método implementó la inmovilización de células y lipasas con un rendimiento máximo de 93.56% con una eficiencia hasta por 10 ciclos, alcanzando resultados similares a los obtenidos con sistemas comerciales.

**Cultivo de microalgas.** En general, las microalgas dependen para su crecimiento de un suministro de carbono y de una fuente de luz para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, como respuesta a los cambios en

las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento diversos tipos de metabolismo (fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico, fotoheterotrófico). Al considerar el empleo de microalgas para la producción de biodiésel, es importante definir cuantitativamente la influencia de factores que intervienen en su crecimiento y que favorecen la producción de lípidos, así como su interrelación para poder manipularlos en la obtención de biomasa con las características deseadas (Arias *et al.*, 2013).

En la actualidad, la producción fotoautotrófica es la única técnica económicamente viable a gran escala para la producción de biomasa (Borowitzka, 1997). Los dos sistemas más ampliamente utilizados son las lagunas abiertas y los fotobiorreactores cerrados (Borowitzka, 1999). La viabilidad técnica de cada uno de estos sistemas se ve influenciada por las propiedades intrínsecas de la cepa seleccionada, así como las condiciones climáticas y los costos por espacio y agua (Borowitzka, 1992).

Un fotobiorreactor es un reactor en el que células de plantas o algas fotótrofas se cultivan o se utilizan para llevar a cabo una reacción fotobiológica. Los sistemas de cultivo abierto son normalmente menos caros de construir y operar, más duraderos que los grandes reactores cerrados y con gran capacidad de producción en comparación con los sistemas cerrados (Yen *et al.*, 2014). En la tabla 2 se muestran las ventajas y desventajas de los fotobiorreactores y las lagunas abiertas.

## BIORREFINERÍA: SISTEMAS DE DOBLE PROPÓSITO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

El concepto de biorrefinación es similar al de refinación de petróleo en que múltiples combustibles y productos químicos se obtienen utilizando el petróleo crudo como material de partida. Biorrefinería, por lo tanto, se define como el procesamiento de biomasa sostenible para obtener energía, biocombustibles y productos de alto valor a través de procesos y equipos para la transformación de biomasa (Trivedi *et al.*, 2015).

También es importante tener en cuenta que el costo de la producción de microalgas es alrededor del 90% de la producción de biodiésel, esto indica que los esfuerzos en el desarrollo y la investigación deben centrarse en reducir los costos de producción de microalgas (Cheali *et al.*, 2015).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los sistemas de lagunas abiertas y fotobiorreactores.

Medio de cultivo	Ventajas	Desventajas	Referencia
Lagunas abiertas	Más baratas de construir y más fáciles de operar <sup>a</sup> Mantenimiento y limpieza más fácil que fotobiorreactores <sup>c</sup>	Baja productividad, por lo tanto, más terreno necesario para el cultivo <sup>b</sup> Contaminaciones provenientes del ambiente <sup>d</sup> Número de especies de microalgas limitadas para este cultivo <sup>e</sup>	Palomino <i>et al.</i> (2010 <sup>a</sup> ) Amaro <i>et al.</i> (2011 <sup>b</sup> ) Brennan <i>et al.</i> (2010 <sup>c</sup> ) Schenk <i>et al.</i> (2008 <sup>d</sup> ) Borowitzka (1999 <sup>e</sup> )
Fotobiorreactores	Producción continua, trabajo mínimo y mejor proceso de proceso y gestión <sup>f</sup> Puede usar luz artificial y natural, lo que aumenta el rendimiento total de las especies de microalgas <sup>b</sup> Mejor control sobre las condiciones de cultivo y mayor número de especies cultivadas <sup>h</sup>	Costo inicial mayor <sup>g</sup> Alto consumo de energía <sup>b</sup>	Arudchelvam <i>et al.</i> (2012 <sup>f</sup> ) Chisti (2007 <sup>g</sup> ) Yen <i>et al.</i> (2014 <sup>h</sup> )

\*La letra que aparece como superíndice relaciona la referencia citada con la respectiva ventaja o desventaja.

El costo de producir biodiésel puede ser teóricamente compensado por los ingresos generados por otros coproductos de la biomasa (Vornortas & Papayannakos, 2014). Las microalgas contienen cantidades significativas de proteínas y carbohidratos, así como pequeñas cantidades de compuestos funcionales de alto valor, por ejemplo, astaxantina, carotenos, clorofila, ácidos grasos libres y ácido linoleico (Rashid *et al.*, 2014). Cada uno de éstos puede ser utilizado para generar productos de interés industrial en una biorrefinería. Estudios recientes han concluido que la producción de biodiésel a escala industrial puede ser económicamente sostenible si la estrategia de la refinería se basara en la producción de biomasa (Wijffels *et al.*, 2010).

En una biorrefinería, los lípidos crudos son fraccionados en compuestos de alto valor agregado y lípidos para biodiésel (acilgliceroles) (Yan *et al.*, 2014). Si las especies de microalgas contienen un alto nivel de proteínas, la biomasa residual de la producción de biodiésel puede ser utilizada como alimentación de ganado. Si la especie contiene altos niveles de carbohidratos, la biomasa residual puede ser fermentada para producir bioetanol (Halim *et al.*, 2012).

Por otro lado, en los últimos años se ha conceptualizado el término “sistemas de doble propósito” para describir al conjunto de procesos encaminados en la reincorporación de nutrientes presentes en efluentes residuales en la producción de biomasa (Olguín, 2012; Robles-Pliego *et al.*, 2015). La biomasa generada, de acuerdo con sus características, puede ser empleada para la obtención de productos de alto valor agregado y biocombustibles, principalmente, en el contexto de una biorrefinería.

Específicamente, en el desarrollo de sistemas de doble propósito en el contexto de biorrefinerías de microalgas, se puede optar por un diseño modular en donde se establezcan procesos y operaciones unitarias bien definidas (Figura 5). Para lo anterior, deben considerarse módulos de biorremediación y obtención de biogás, como los módulos de pretratamiento de efluentes residuales y el de digestión anaerobia de residuos con elevada carga orgánica; un módulo por etapas de cul-

tivos monoalgales o en consorcios microalga-bacteria; un módulo de recuperación de biomasa mediante métodos mecánicos, así como asistidos por procesos fisicoquímicos, como la inducción de floculación; y el módulo de obtención de productos de interés, en donde se llevan a cabo procesos de extracción o reacción y purificación.

En lo que respecta al módulo de cultivo de microalgas por etapas, en la Figura 6 se muestra un ejemplo de las etapas en el cultivo de microalgas. La primera etapa consiste en la preservación de cepas, la producción y propagación del inóculo en fotobiorreactores. La producción del inóculo se realiza bajo condiciones controladas de crecimiento en medios de cultivo minerales sintéticos y estériles, lo que significa bajos volúmenes de producción. Por su parte, la propagación del inóculo se puede realizar en condiciones asépticas o en medios no estériles y con medios sintéticos o alternativos, como diluciones de efluentes residuales con agua corriente. Sin embargo, esto último lleva consigo la posible contaminación del inóculo y la competencia por nutrientes con otros microorganismos presentes en los medios alternativos no estériles (Olguín *et al.*, 2013).

La segunda y tercera etapa del módulo se enfocan en la producción a mayor escala de las cepas o consorcios de microalgas de interés. El objetivo de la segunda etapa es obtener cultivos con alta densidad celular, por lo regular superiores a 1 g/L. En esta etapa se implementan cultivos fotoautotróficos, heterotróficos y mixotróficos, que se distinguen de acuerdo a la adición de su fuente de carbono y de su modo de operación (Lowrey *et al.*, 2015).

En los cultivos fotoautotróficos la fuente de carbono es inorgánica, regularmente  $\text{CO}_2$ , proporcionada mediante una mezcla aire- $\text{CO}_2$ , en donde la concentración de  $\text{CO}_2$  regularmente no rebasa el 10% (v/v) y la energía lumínica para las funciones fotosintéticas de las microalgas es suplementada por luz natural o artificial. En el caso de luz natural el fotoperiodo estará definido por la posición geográfica y estación del año, mientras que en caso de luz artificial los cultivos se pueden operar inclusive bajo luz continua.

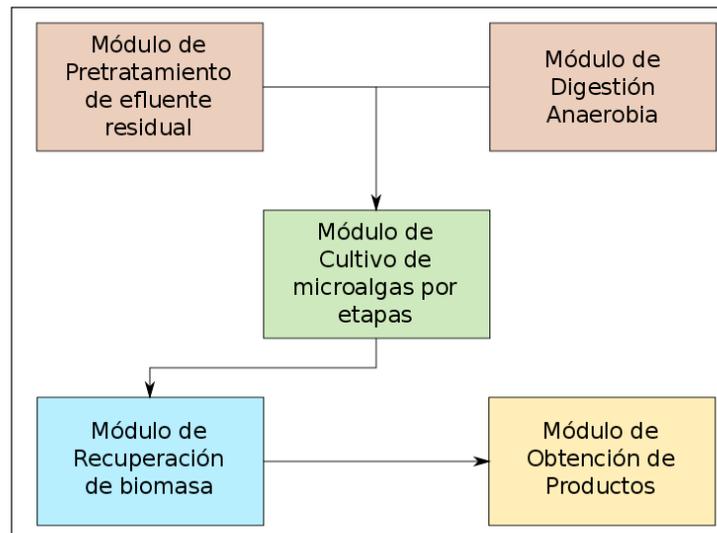


Figura 5. Diagrama modular de operación de sistemas de doble propósito para el cultivo de microalgas.

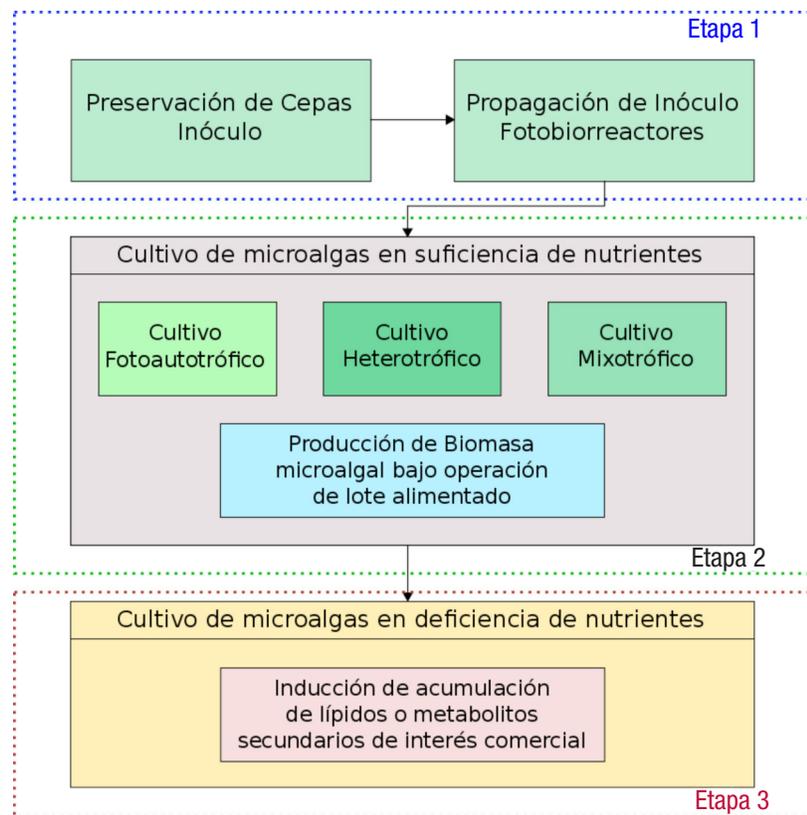


Figura 6. Diagrama de bloques en el cultivo de microalgas por etapas.

En cultivos heterotróficos la fuente de carbono es orgánica, como glucosa, glicerol, algún ácido graso de bajo peso molecular (AGV) o en algunos casos se han utilizado residuos industriales ricos en glucosa como la melaza (Bumbak *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2013). Estos cultivos se realizan en fermentadores de gran capacidad bajo condiciones controladas de pH, temperatura, agitación y sin fuente de energía luminosa. La operatividad de estos procesos resulta costosa; sin embargo, las mayores densidades celulares en el cultivo de microalgas se alcanzan en este tipo de cultivos y en condiciones asépticas, por lo que son ampliamente utilizados para la obtención de nutraceuticos y productos de consumo humano (Bumbak *et al.*, 2011).

En los cultivos mixotróficos se tienen ambas fuentes de carbono, orgánica e inorgánica, además de una fuente de luz, de manera que la microalga puede aprovechar ambas fuentes de carbono para su crecimiento (Lowrey *et al.*, 2015). En sistemas de doble propósito la fuente orgánica de estos cultivos regularmente proviene de carbono de efluentes con elevada carga orgánica (digestato) y el carbono inorgánico de mezcla de gases de combustión y aire (Olguín *et al.*, 2015a; 2015b). En algunos casos también se ha optado por sales de carbonato como fuente inorgánica de carbono (Murray *et al.*, 2012; Olguín *et al.*, 2015b).

Ya que en la segunda etapa del módulo de cultivo de microalgas el principal objetivo es maximizar la producción de biomasa, en la Figura 6 se sugiere que los cultivos sean operados como lote alimentado, de esta manera se ha observado que se obtienen altas densidades celu-

lares incluso en cultivos en continuo (Cheirsilp & Torpee, 2012; Ji *et al.*, 2015). Bajo operación de lote alimentado los nutrientes que son rápidamente consumidos son repuestos periódicamente, de manera que la densidad no disminuya por la falta de nutrientes. En cultivos mixotróficos, donde los nutrientes provienen de efluentes residuales, la operación por lote alimentado puede no ser la más apropiada, ya que agregar periódicamente efluente residual al cultivo incrementa la turbidez y limita el paso de luz inhibiendo los procesos fotosintéticos de las microalgas. Ante esto, para la operación de lote alimentado en estos cultivos se puede optar por agregar sales minerales de bajo costo únicamente de los macronutrientes más importantes, como  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , que cumple la doble función de ser fuente tanto de nitrógeno como de carbono (Olguín *et al.*, 2015b).

El objetivo de la tercera etapa es la inducción de acumulación de productos de interés. Estos pueden ser lípidos o metabolitos secundarios, como pigmentos o carotenoides, que ante condiciones de estrés la microalga utiliza como mecanismos de defensa (Hu *et al.*, 2008; Lemoine & Schoefs, 2010; Mulders *et al.*, 2014). En el caso de los lípidos, se considera que ante estrés nutricional o fotoinhibitorio, las microalgas acumulan estos en organelos que sirven como depósitos de reserva de energía (Wijffels & Barbosa, 2010; Klok *et al.*, 2013). La falta o limitación de nitrógeno en los medios de cultivo de microalgas se considera como el principal estrés nutricional involucrado en la acumulación de lípidos y de metabolitos secundarios (Gouveia & Oliveira, 2009).

La etapa de estrés puede realizarse en los mismos fotobiorreactores de la segunda etapa sin la adición de nutrientes y alargando el tiempo de residencia, hasta obtener la máxima acumulación de metabolitos de interés sin que se presente una disminución significativa de su densidad celular. Durante la operación de esta etapa no se aconseja la dilución del medio de cultivo para disminuir la concentración de nutrientes, ya que esto a su vez diluye la densidad celular y dificulta aún más la recuperación de biomasa.

Con un enfoque sustentable de sistemas de doble propósito, la Figura 7 muestra el diagrama de bloques para obtención de productos de alto valor agregado y biocombustibles a partir del cultivo de microalgas en dos procesos interconectados en el concepto de una biorrefinería. En el Proceso I, para la obtención de pigmentos y nutraceuticos, el cultivo supone condiciones de crecimiento controladas y medios de cultivo estériles. Mientras que en el Proceso II, el cultivo de las microalgas o consorcio microalgas-bacterias se realiza en condiciones exteriores a grandes volúmenes y bajos costos de operación.

Aun cuando se tiene toda esta información sobre la producción de biodiésel y la obtención de compuestos de alto valor agregado a partir de la biomasa de microalgas, existe mucho campo fértil para realizar investigación sobre el mejoramiento de métodos de cultivo, la identificación y obtención de nuevos productos, mejoramiento de procesos de cosecha y de extracción de compuestos, análisis de ciclo de vida y estudios de viabilidad económica, entre muchos otros (Freire *et al.*, 2011).

### CONCLUSIONES

La necesidad de desarrollar combustibles renovables y ecológicos es cada vez más evidente. El uso de microalgas para la obtención de biodiésel representa una alternativa viable por su alto contenido lipídico y su perfil de ácidos grasos, sin embargo, hace falta el desarrollo de tecnologías que reduzcan el costo de producción. La transesterificación en la actualidad resulta ser el método más barato para la producción de biodiésel. Sin embargo, actualmente no se han logrado precios competitivos frente a los producidos a partir de recursos fósiles. Los principales factores que incrementan los precios de obtención de biodiésel son los métodos de cultivo, la extracción de lípidos (*downstream*) y los procesos de bioconversión.

El uso de campos eléctricos, extracción por presurización cíclica, microondas y sonicación se perfilan como métodos novedosos para la recuperación de lípidos intracelulares. Actualmente, el proceso de transesterificación puede realizarse mediante el uso de lipasas comerciales o mediante la catálisis directa, utilizando microorganismos como levaduras y hongos filamentosos. Los sistemas de cultivo de doble propósito son un proceso novedoso que podría disminuir los costos, debido a que permite incrementar la biomasa reincorporando los nutrientes presentes en efluentes residuales. En este trabajo, además, se propone un diseño modular para sistemas de doble propósito y se describen detalladamente diferentes etapas de este diseño, principalmente enfocadas en el módulo de cultivo de microalgas que es la parte nodal de esta investigación.

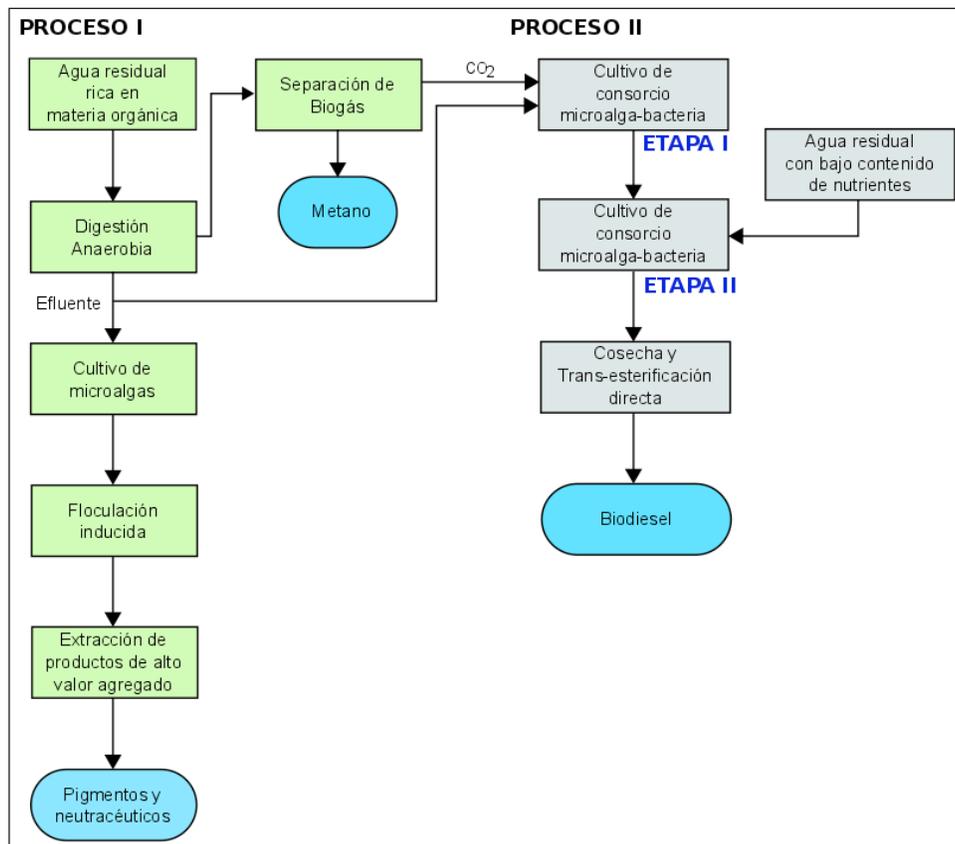


Figura 7. Diagrama de bloques para el cultivo de microalgas en un sistema de doble propósito aplicado al concepto de biorrefinería.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Guanajuato por el apoyo institucional otorgado mediante los proyectos CIFOEA 012/2015 y CIFOEA 126/2016.

## REFERENCIAS

- AARTHY, M., P. SARAVANAN, M. K. GOWTHAMAN, C. ROSE & N. R. KAMINI. 2014. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical Engineering Research and Design* 92: 1591-1601. DOI: 10.1016/j.cherd.2014.04.008.
- ABOMOHRRA, A. E., W. JIN & M. EL-SHEEKH. 2016. Enhancement of lipid extraction for improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Energy Conversion and Management* 108: 23-29. DOI: 10.1016/j.enconman.2015.11.007
- ACA-ACA, M. G., G. E. CAMPOS & O. SÁNCHEZ-DAZA. 2009. Estimación de propiedades termodinámicas de los compuestos involucrados en la producción de biodiesel. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales* 22: 15-19.
- ACOSTA, O. & A. CHAPARRO-GIRALDO. 2009. Biocombustibles, Seguridad Alimentaria y Cultivos Transgénicos. *Revista de Salud Pública* 11: 290-300.
- AGUIERIAS, E. C. G., E. D. CAVALCANTI-OLIVEIRA & D. M. G. FREIRE. 2015. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel* 159: 52-67. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.06.064.
- AKHO, C. C., S. W. CHANG, G. C. LEE & J. F. SHAW. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8995-9005. DOI: 10.1021/jf071724y.
- ALVA, M.S. DE, V.M. LUNA-PABELLO, E. CADENA, & E. ORTÍZ. 2013. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology* 146: 744-748. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.061.
- AMARO, H. M., A. C. GUEDES & F. X. MALCATA. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88: 3402-3410. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.12.014.
- ANANDARAJAH, K., G. MAHENDRAPERUMAL, M. SOMMEFELD & H. QIANG. 2012. Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Applied Energy* 96: 371-377. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.02.057
- ARIAS, M. T., A. J. MARTÍNEZ, R. O. CAÑIZARES. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros de cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana* 18: 1-19.
- ARUDCHELVAM, Y. & N. NIRMALAKHANDAN. 2013. Energetic optimization of microalgal cultivation in photobioreactors for biodiesel production. *Renewable Energy* 56: 77-84. DOI: 10.1016/j.renene.2012.09.042.
- ATABANI, A. E., A. S. SILITONGA, I. A. BADRUDDIN, T. M. I. MAHLIA, H. H. MASJUKI & S. MEKHILEF. 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:2070-2093. DOI: 10.1016/j.rser.2012.01.003.
- BAGCHI, S. K., P. S. RAO & MALLICK, N. 2015. Development of an oven drying protocol to improve biodiesel production for an indigenous chlorophycean microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 180: 207-213. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.092.
- BATISTA, G., G. A. S. SUREK, C. BENICÁ, M. L. CORAZA & E. F. ZANOELO. 2016. Cyclic pressurization assisted extraction of lipids from microalgae for biodiesel production: Non-equilibrium and equilibrium data. *Fuel* 163: 133-138. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.09.051.
- BOROWITZKA, M. A. 1992. Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *Journal of Applied Phycology* 7: 3-15. DOI: 10.1007/BF02161212.
- BOROWITZKA, M. A. 1997. Algae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9: 393-401. DOI: 10.1023/A:1007921728300
- BOROWITZKA, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70:313-21. DOI: 10.1016/S0168-1656(99)00083-8
- BRENNAN, L & P. OWENDE. 2010. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- BUMBAK, F., S. COOK, V. ZACHLEDER, S. HAUSER & K. KOVAR. 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 31-46. DOI: 10.1007/s00253-011-3311-6
- CASTILLO-LÓPEZ, B., L. E. CERDÁN, A. ROBLES-MEDINA, E. NAVARRO-LÓPEZ, L. MARTÍN-VALVERDE, E. HITA-PEÑA, P. A. GONZÁLEZ-MORENO & E. MOLINA-GRIMA. 2015. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119: 706-711. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.002
- CHEALI, P., A. VIVION, K. V. GERNAEY & G. SIN. 2015. Optimal design of algae biorefinery processing networks for the production of protein, ethanol and biodiesel. *In: K. V. Gernaey, J. K. Huusom & R. Gani (Eds.) Proceedings of the 25th European Symposium on Computer Aided Process Engineering* 37: 1151-1156. Elsevier Science, Computer-Aided Chemical Engineering. DOI: 10.1016/B978-0-444-63577-8.50037-1
- CHEIRSLIP, B. & TORPEE, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology* 110: 510-516. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.125
- CHI, L., C. YAO, X. CAO. & XUE, S. 2016. Coordinated regulation of nitrogen supply mode and initial cell density for energy storage compounds production with economized nitrogen utilization in a marine microalga *Isochrysis zhangjiangensis*. *Bioresource Technology* 200: 598-605. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.059
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- CHO, K., K. KIM, N. LIM, M. KIM, J. HA, H. HO & S. WOON. 2015. Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Biomass and Bioenergy* 72: 1-7. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.11.014

- DAI, Y. M., CHEN, K. T. & CHEN, C. C. 2014. Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal* 250: 267–273. DOI: 10.1016/j.cej.2014.04.031
- DALMAS-NETO, C. J., E. BITTENCOURT-SYDNEY, R. ASSMANN, D. C. NETO & C. R. SOCCOL. 2014. Production of Biofuels from Algal Biomass by Fast Pyrolysis. In: Pandey, A., D.-J. Lee, Y. Chisti & C.R. Soccol (Eds.). *Biofuels from Algae*, Elsevier, pp. 143-153
- DURAIARASAN, S., S. A. RAZACK, A. MANICKAM, A. MUNUSAMY, M. B. SYED, M. Y. ALI, G.M. AHMED & Md. S. MOHIUDDIN. 2016. Direct conversion of lipids from marine microalga *C. salina* to biodiesel with immobilized enzymes using magnetic nanoparticle. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4: 1393-1398. DOI: 10.1016/j.jece.2015.12.030
- FENG, P., K. YANG, Z. XU, Z. WANG, L. FAN, L. QIN & S. ZHU. 2014. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology* 173: 406-414. DOI: doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123
- FENG, P., Z. DENG, Z. HU & L. FAN. 2011. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology* 102: 10577-10584. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.109.
- FLISAR, K., M. S. HABERL, J. MORELJ, J. GOLOB & D. MIKLAVCIC. 2014. Testing a prototype pulse generation for a continuous flow system and its use for *E.coli* inactivation and microalgae lipid extraction. *Bioelectrochemistry* 100: 44-51. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2014.03.008
- FREIRE, D. M. G., J. S. DE SOUSA, & E. A. CAVALCANTI-OLIVEIRA. 2011. Biotechnological methods to produce biodiesel. In: A. Pandey, C. Larroche, S. C. Ricke, C.-G. Dussap & E. Gnansounou (Ed.) *Biofuels. Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, Academic Press, San Diego, pp. 315-337. DOI: 10.1016/B978-0-12-385099-7.00014-0
- FRUMENTO, D., A. A. CASAZZA, S. AL ARNHI & A. CONVERTI. 2013. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal* 81: 120-125. DOI: 10.1016/j.bej.2013.10.011
- GARIBAY, A., R. VÁZQUEZ-DUHALT, M. P. SÁNCHEZ, L. SERRANO & A. MARTÍNEZ. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13: 38-61
- GOG, A., M. ROMAN, M. TOS, C. PAIZS & F. DAN. 2012. Biodiesel production using enzymatic transesterification. *Current State and Perspectives* 39: 10–16. DOI: 10.1016/j.renene.2011.08.007
- GOUVEIA, L. & A.C. OLIVEIRA. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 269-274. DOI: 10.1007/s10295-008-0495-6
- GUI, X., G. WANG, X. LI & Y. YAN. 2014. Fungus-assisted mild acid pretreatment of *Glycyrrhiza uralensis* residues to enhance enzymatic hydrolysis and oil production by green microalgae *Chlorella protothecoides*. *Industrial Crops and Products* 62: 466-473. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.024
- GULDHE, A., P. SINGH, S. KUMARI, I. RAWAT, K. PERMAUL & BUX, F. 2016. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. *Renewable Energy* 85: 1002-1010. DOI: 10.1016/j.renene.2015.07.059
- GUSCHINA, I. A. & J. L. HARWOOD. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45: 160-186. DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.001
- HALIM, R., M. K. DANQUAH & P. A. WEBLEY. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30: 709-732. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001
- HAN, F., H. PEI, W. HU, L. JIANG, J. CHENG & L. ZHANG. 2016. Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. *Bioresource Technology* 209: 16-22. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.103
- HARWOOD, J. L. & I. A. GUSCHINA. 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91: 679-684. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.11.004
- HIDALGO, P., G. CIUDAD & R. NAVIA. 2016. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. *Bioresource Technology* 201: 360-364. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.031
- HU, Q., M. SOMMERFELD, E. JARVIS, M. GHIRARDI, M. POSEWITZ, M. SEIBERT & A. DARZINS. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621-639. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- HWA, S. T., Y. H. TAUFIQ-YAP & F. L. NG. 2014b. Alumina supported/unsupported mixed oxides of Ca and Mg as heterogeneous catalysis for transesterification of *Nannochloropsis sp.* Microalgae's oil. *Energy Conversion and Management* 88:1193-1199. DOI: 10.1016/j.enconman.2014.04.049.
- HWA, S., A. ISLAM, T. YUSAF & Y. HIN. 2014a. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalgae's oil to biodiesel using calcium methoxide catalyst. *Energy* 78: 63-71. DOI: 10.1016/j.energy.2014.07.045.
- JAIMES-DUARTE, D. L., W. SOLER-MENDOZA, J. VELASCO-MENDOZA, Y. MUÑOZ-PAÑALOZA & N. A. URBINA-SUÁREZ. 2012. Characterization *Chlorophyta* microalgae with potential in the production of lipid for biofuels. *Ciencia Tecnología y Futuro* 5: 93-102.
- JI, F., Y. ZHOU, A. PANG, L. NING, K. RODGERS, Y. LIU & R. DONG. 2015. Fed-batch cultivation of *Desmodesmus sp.* in anaerobic digestion wastewater for improved nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology* 184: 116-122. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.144.
- KIM, G., J. BAE & K. LEE. 2016. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis sp.* *Bioresource Technology* 205: 274-279. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.045.
- KLOK, A. J., D. E. MARTENS, R. H. WUJFFELS & P. P. LAMERS. 2013. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresource Technology* 134: 233-243. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.02.006.
- KOLLER, M., A. SALERNO, P. TUFFNER, M. KOINIGG, H. BÖCHZELT, S. SCHÖBER, S. PIEBER, H. SCHNITZER, M. MITTELBACH & G. BRAUNEGG. 2012. Characterisation and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of Cleaner Production* 37: 377-388. DOI: 10.1016/j.jclepro.2012.07.044.
- KONG, Q., L. LI, B. MARTINEZ, P. CHEN & R. RUAN. 2010. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 9-18. DOI: 10.1007/s12010-009-8670-4.

- LA RUSSA, M., C. BOGEN, A. UHMEYER, A. DOEBBE, E. FILIPPONE, O. & KRUSE, J.H. MUSSGNUM. 2012. Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology* 162:13-20. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.006.
- LEE, A. K., D. M. LEWIS & P.J. ASHMAN. 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy* 46: 89-101. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034.
- LEMOINE, Y. & B. SCHOEFS. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research* 106: 155-177. DOI: 10.1007/s11120-010-9583-3.
- LI, T., Y. ZHENG, L. YU & S. CHEN. 2013. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresource Technology* 131: 60-67. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.121.
- LI, Y.R., M-F. SHUE, Y-C. HSU, W-L. LAI & J-J. CHEN. 2014. Application of factorial design methodology for optimization of transesterification reaction of microalgae lipids. *Energy Procedia* 52: 377-382. DOI: 10.1016/j.egypro.2014.07.089.
- LI, Z., H. YUAN, J. YANG & B. LI. 2011. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology* 102: 9128-9134. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.07.004.
- LIU, J., Z. SUN, Y. ZHONG, H. GERKEN, J. HUANG & F. CHEN. 2013. Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by a *Chlorella zofingiensis* mutant. *Journal of Applied Phycology* 25: 1447-1456. DOI: 10.1007/s10811-013-9974-x.
- LIU, T., Y. LI, F. LIU & C. WANG. 2016. The enhanced lipids accumulation in oleaginous microalga by the potential continuous nitrogen-limitation (CNL) strategy. *Bioresource Technology* 203: 150-159. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.021.
- LOWREY, J., M. S. BROOKS & P. J. MCGINN. 2015. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges-a critical review. *Journal of Applied Phycology* 27: 1485-1498. DOI: 10.1007/s10811-014-0459-3.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D., A. ROBLES-MEDINA, E. HITA-PENA, M.J. JIMÉNEZ-CALLEJÓN, L. ESTÉBAN-CERDÁN, P.A. GONZÁLEZ-MORENO & E. MOLINA-GRIMA. 2015. Biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification. *Fuel* 150: 14-20. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.01.106.
- MATHIMANI, T., L. UMA & D. PRABAHARAN. 2015. Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella sp.* BDUG 91771 lipid. An efficient biodiesel yield and its characterization. *Renewable Energy* 81: 523-533. DOI: 10.1016/j.renene.2015.03.059.
- MENG, X., G. XU, Q-L. ZHOU, J-P. WU & L-R. YANG. 2014. Highly efficient solvent-free synthesis of 1-3-diacylglycerol by lipase immobilised on nano-sized magnetite particles. *Food Chemistry* 143: 319-324. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.07.132
- MORALES-SÁNCHEZ, D., R. TINACO-VALENCIA, M. A. CARO-BERMÚDEZ, A. MARTINEZ, 2014. Culturing *Neochloris oleabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system enhance lipid and carbohydrate accumulation. *Algal Research* 5: 61-69. DOI: 10.1016/j.algal.2014.05.006.
- MU, J., S. LI, D. CHEN, H. XU, F. HAN, B. FENG & Y. LI. 2015. Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. *Bioresource Technology* 185: 99-105. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.082.
- Mulders, K. J. M., P. P. Lamers, D. E. Martens & R. H. Wijffels. 2014. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology* 50: 229-242. DOI: 10.1111/jpy.12173.
- MURRAY, K. E., J. A. SHIELDS, N. D. GARCIA & F. G. HEALY. 2012. Productivity, carbon utilization, and energy content of mass in scalable microalgae systems. *Bioresource Technology* 114: 499-506. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.012.
- NAKANISHI, A., S. AIKAWA, S. HO, C. CHEN & J. CHANG. 2014. Development of lipid productivities under different CO<sub>2</sub> conditions of marine microalgae *Chlamydomonas sp.* JSC4. *Bioresource Technology* 152: 247-252. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.009.
- NAVARRO-LÓPEZ, E., A. ROBLES-MEDINA, P.A. GONZÁLEZ-MORENO, M.J. JIMÉNEZ-CALLEJÓN, L. E. CERDÁN, L. MARTÍN-VALVERDE, B. CASTILLO-LÓPEZ & E. MOLINA-GRIMA. 2015. Enzymatic production of biodiesel from *Nannochloropsis gaditana* lipids: Influence of operational variables and polar lipid content. *Bioresource Technology* 187: 346-353. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.126.
- NETO A. M. P., R. A. S. DE SOUZA, A. D. LEON-NINO, J. D. A. DA COSTA, R. S. TIBURCIO, T. A. NUNES, T. C. S. DE MELLO, F. T. KANEMOTO, F. M. P. SALDANHA-CORREA, & S. M. F. GIANESELLA. 2013. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. *Renewable Energy* 55: 525-531. DOI: 10.1016/j.renene.2013.01.019.
- NOBRE, B. P., F. VILLALOBOS, B. E. BARRAGÁN, A. C. OLIVEIRA, A. P. BATISTA, P. A. S. S. MARQUES & L. GOUVEIA. 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis sp.* microalga. Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresource Technology* 135: 128-136. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.084.
- OGNJANOVIC, N., D. BEZBRADICA & Z. KNEZEVIC-JUGOVIC. 2009. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology* 100: 5146-5154. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.05.068.
- OHLOGGE, J. & J. BROWSE. 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7: 957-970.
- OLGUÍN, E. J. 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances* 30: 1031-1046. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.05.001.
- OLGUÍN, E. J., A. MENDOZA, R. E. GONZÁLEZ-PORTELA & E. NOVELO. 2013. Population dynamics in mixed cultures of *Neochloris oleabundans* and native microalgae from water of a polluted river and isolation of a diatom consortium for the production of lipid rich biomass. *New Biotechnology* 30: 705-715. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.03.003.
- OLGUÍN, E. J., E. DORANTES, O. S. CASTILLO & V. J. HERNÁNDEZ-LANDA. 2015b. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleabundans* cultures. *Journal of Applied Phycology* 27: 1813-1822. DOI: 10.1007/s10811-015-0540-6.

- OLGUÍN, E. J., O. S. CASTILLO, A. MENDOZA, K. TAPIA, R. E. GONZÁLEZ-PORTELA & V.J. HERNÁNDEZ-LANDA. 2015a. Dual purpose system that treats anaerobic effluents from pig waste and produce *Neochloris oleoabundans* as lipid rich biomass. *New Biotechnology* 32: 387-395. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.12.004.
- ORTIZ, R. W. P. C., BENINCÁ & E. F. ZANOLO. 2015. Cyclically pressurized extraction of solutes from ground coffee: kinetic experiments and modeling. *Separation and Purification Technology* 141: 256-62. DOI: 10.1016/j.seppur.2014.12.004.
- PALOMINO, A., C. ESTRADA & J. LÓPEZ. 2010. Microalgas: potencial para la producción de biodiesel. In: O. R. Ribeiro & R. W. da Costa (Ed). *Memoria in extenso IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas*, EMBRAPA, João Pessoa pp. 149-157.
- PIEBER, S., S. SCHÖBER & M. MITTELBACH. 2012. Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*. *Biomass and Bioenergy* 47: 474-482. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.10.019.
- RASHID, N., M.S.U. REHMAN, M. SADIQ, T. MAHMOOD & J. I. HAN. 2014. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40: 760-778. DOI: 10.1016/j.rser.2014.07.104.
- RATTANAPOLTEE, P. & P. KAEWKANNETRA. 2014. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. *Energy* 78: 4-8. DOI: 10.1016/j.energy.2014.06.049.
- REN, H.-Y., B.-F. LUI, F. KONG, L. ZHAO, G. J. XIE & N.-Q. REN. 2014. Enhanced lipids accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource Technology* 169: 763-767. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.06.062.
- ROBLES-MEDINA, A., P. A. GONZÁLEZ-MORENO, L. ESTEBAN-CERDÁN & E. MOLINA-GRIMA. 2009. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances* 27: 398-408. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.008.
- ROBLES-PLIEGO, M., E. J. OLGUÍN, J. HERNÁNDEZ-LANDA, R. E. GONZÁLEZ-PORTELA, G. SÁNCHEZ-GALVÁN & F. CUERVO-LÓPEZ. 2015. Dual purpose system for water treatment from a polluted river and the production of *Pistia stratiotes* biomass within a biorefinery. *Clean Soil Air Water* 43: 1445-1558.
- SANTOS, A. M., P. P. LAMERS, M. JANSSEN & R. H. WIJFFELS. 2013. Biomass and lipid productivity of *Neochloris oleoabundans* under alkaline – saline conditions. *Algal Research* 2: 204-211. DOI: 10.1002/cle.201400222.
- SCHENK, P. M., S. THOMAS-HALL, E. STEPHENS, U. C. MARX, J. H. MUSSGUNG & C. POSTEN. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Resource* 1: 20-43. DOI: 10.1007/s12155-008-9008-8.
- SEO, Y. H., M. SUNG, Y. K. OH & J. I. HAN. 2015. Lipid extraction and esterification for microalgae-based biodiesel production using pyrite (FeS<sub>2</sub>). *Bioresource Technology* 191: 420-425. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.083.
- SIBI, G., V. SHETTY & K. MOKASHI. 2015. Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels, a review. *Journal of the Energy Institute* 89 :1–5. DOI: 10.1016/j.joei.2015.03.008.
- SINGH, P., A. GULDHE, S. KUMARI, I. RAWAT & F. BUX. 2015. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 94: 22-29. DOI: 10.1016/j.bej.2014.10.019.
- ŞIRIN, S. & M. SILLANP. 2015. Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel. *Biore-source Technology* 191: 79-87. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.094.
- SLADE, R. & A. BAUEN. 2013. Microalgae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy* 53: 29–38. DOI:10.1016/j.biombioe.2012.12.019.
- SOLANA, M., C. S. RIZZA & A. BERTUCO. 2014. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluids extractions of lipids: comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids* 92: 311-318. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.06.013.
- SUARSINI, E. & SUBANDI. 2011. Utilization ultrasonic to increase the efficiency of oil extraction for microalgae indigenous isolates from pond gresik, east java. In: *Proceedings of the 2011 IEEE Conference on Clean Energy and Technology (CET)*, pp. 275-279. DOI: 10.1109/CET.2011.6041496
- SURENDRHIRAN, D., M. VIJAY & A. R. SIRAJUNNISA. 2014. Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2: 1294-1300. DOI: 10.1016/j.jece.2014.05.004.
- SYDNEY, B. E., W. STURM., J.C DE CARVALHO., V. THOMAZ-SOCCOL., C. LARROCHE., A.PANDEY. & R. C. SOCCOL. 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology* 101, 5892-5896. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.088.
- TAHER, H., S. AL-ZUHAIR, A. H. AL-MARZOUQI, Y. HAIK & M. FARID. 2014. Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy* 66: 159-167. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.02.034.
- TANG, D., W. HAN, P. LI, X. MIAO & J. ZHONG. 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology* 102: 3071-3076. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.047.
- TRIPATHI, R., J. SINGH & T. I. SHEHAR. 2015. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy* 74: 774-781. DOI: 10.1016/j.renene.2014.09.005.
- TRIVEDI, J., M. AILA, D. P. BANGWAL, S. KAUL & M. O. GARG. 2015. Algae based biorefinery-How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 47: 295-307. DOI: 10.1016/j.rser.2015.03.052.
- VONORTAS, A. & N. PAPAYANNAKOS. 2014. Comparative analysis of biodiesel versus green diesel. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment* 3: 3-23. DOI: 10.1002/wene.78.

- WANG, X., J. LIANG, C. LUO, C. CHEN & Y. GAO. 2014. Biomass, total lipid production and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology* 161: 124-130. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.012.
- WIJFFELS, R. H. & M. J. BARBOSA. 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329: 796-799. DOI: 10.1126/science.1189003.
- WIJFFELS, R. H., M. J. BARBOSA & M. H. M. EPPINK. 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels Products & Bio-refining* 4: 287-295. DOI: 10.1002/bbb.215.
- XIA, L., S. SONG, Q. HE, H. YANG & C. HU. 2014. Selection of microalgae for biodiesel production in a scalable outdoor photobioreactor in north China. *Bioresource Technology* 174: 274-280. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.008.
- XUE, J., Y. NIU, T. HUANG, W. YANG, J. LIU & H. LI. 2015. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. *Metabolic Engineering* 27: 1-9. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.10.002.
- YAN, Y., X. LI, G. WANG, X. GUI, G. LI, F. SU & T. LIU. 2014. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. *Applied Energy* 113: 1614-1631. DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.09.029.
- YEN, H., HU, I., CHEN, C & CHANG, J. 2014. Design of Photobioreactors for Algal Cultivation. *In: Pandey, A., D-J. Lee, Y. Chisti & C.R. Soccol (Eds.). Biofuels from Algae* Elsevier. pp. 23-45.
- YU, W-L., W. ANSARI., N.G. SCHOEP, N.G., M. J. HANNON, S. P. MAYFIELD & M.D. BURKART. 2011. Modifications of the metabolic pathway of lipids and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories* 10: 1-11. DOI: 10.1186/1475-2859-10-91.
- ZHANG, Y., Y. LIU, X. CAO, P. GAO, X. LIU, X. WANG, J. ZHANG, J. ZHOU, S. XUE, G. XU & J. TIAN. 2016. Free amino acid and small molecular acids profiling of marine microalga *Isochrysis zhangjiangensis* under nitrogen deficiency. *Algal Research* 13: 207-2017. DOI: 10.1016/j.algal.2015.12.001.
- ZHU, J., J. RONG & B. ZONG. 2013. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis* 34: 80-100. DOI: 10.1016/S1872-2067(11)60497-X.