UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACION TECNO-ECONOMICA DE LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS

TECHNO-ECONOMIC ASSESSMENT OF BIOFUEL PRODUCTION FROM MICROALGAE

Juan Jacobo Jaramillo Obando

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Maestría en Ingeniería-Ingeniería Química

Manizales, Colombia

2011

EVALUACION TECNO-ECONOMICA DE LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS

Juan Jacobo Jaramillo Obando

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D., Carlos Ariel Cardona Alzate

Profesor Deparatmento de Ingeniería Química

Línea de Investigación: Procesos Reacción-Separación

Grupo de Investigación: Procesos Químicos Catalíticos y Biotecnológicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Maestría en Ingeniería-Ingeniería Química

Manizales, Colombia

2011

Agradecimientos

Es sensato agradecer en primera instancia por este trabajo tan arduo y gratificante a Dios. En segunda instancia agradecer la colaboración y apoyo tanto académica como formalmente al profesor Carlos Ariel Cardona Alzate, su apoyo y dedicación permanente fue vital en la consecución de esta tesis. Agradecer de igual forma al profesor Johnny Tamayo por tenerme en cuenta en sus proyectos y consecución de fondos. Al grupo de investigación en Procesos Químicos Catalíticos y biotecnológicos en especial al Ing. Qco y MSc. Luis Eduardo Rincón “Sensei” por sus enseñanzas y su paciencia. De igual forma, agradecer a mi madre Alicia, por su dedicación, apoyo y desvelo por mi bienestar y a mi novia Catalina, mi apoyo, mi polo, mi corazón.

Resumen

La finalidad de este trabajo de tesis fue estudiar la producción de biodiesel y Bioetanol a partir de microalgas ricas en aceite y almidón a bajo costo. Todo esto respetando la tierra cultivable para alimentos siendo amigable con el ambiente. A lo largo de esta propuesta se muestran técnicas de cultivo de biomasa de microalgas en sistemas abiertos y cerrados, métodos de recolección, extracción de metabolitos y dos caminos para la obtención de biocombustibles, al caso, etanol y biodiesel. Se busca evaluar el potencial de las microalgas a nivel industrial vía modelación y simulación. Para esto se evalúa el proceso de producción y su impacto económico, ambiental y social. Todo lo anterior fue analizado desde la óptica de procesos multiproducto aproximados a biorefinerías. Además de examinar a nivel experimental el cultivo de biomasa de microalga en sistemas heterotróficos adecuados a las necesidades de monitoreo y en sistemas cerrados tipo fotoreactor.

Palabras clave: microalgas, *Chlorella Vulgaris, Chlorella protothecoides, Schyzotrium sp N-2*, Biocombustibles, Cogeneración, Biorefinería

Abstract

The purpose of this thesis was to study the production of bioethanol and biodiesel from microalgae rich in oil and starch at low cost. All this while respecting the arable land for food being environmentally friendly. Throughout this proposal are culture techniques microalgae biomass in open and closed systems, methods of collection, extraction of metabolites and two ways to obtain biofuels, the case, ethanol and biodiesel. It seeks to assess the potential of microalgae industrial level via modeling and simulation. For that evaluates the process of production and its economic, environmental and social. All this was discussed from the viewpoint of multiproduct process approximate to biorefineries. In addition to examining experimentally the cultivation of microalgae biomass of

heterotrophic systems appropriate to the needs of monitoring and type photoreactor in closed systems.

Keywords: Microalgae, *Chlorella vulgaris, Chlorella protothecoides, Schyzotrium sp N-2*, Biofuels, Cogeneration, Biorefinery.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Introducción **1**

Hipótesis **4**

Objetivo General **5**

Objetivos Específicos **6**

1. Capítulo 1: Generalidades de la producción de biocombustibles a partir de microalgas 7

1.1 Cultivo de biomasa de algas 13
1.1.1 Cultivos Fototróficos 15
1.1.2 Cultivos Heterotróficos 16
1.1.3 Cultivos Mixotróficos 16
1.1.4 Cultivos Fotoheterotróficos 16
1.2 Sistema de Cultivo y crecimiento de biomasa de algas. 17
1.2.1 Sistemas Abiertos 18
1.2.2 Sistemas Cerrados 18
1.3 Esquemas de recuperación de biomasa de microalgas. 19
1.3.1 Filtración 22
1.3.2 Floculación-Coagulación 22
1.3.3 Centrifugación 23
1.3.4 Sedimentación por gravedad 23
1.3.5 Flotación 23
1.3.6 Electroforesis 24
1.3.7 Secado o deshidratación 24
1.4 Procesamiento de la biomasa de microalga y recuperación de metabolitos 25
1.5 Obtención de Biodiesel y alcohol carburante a partir de microalgas 26
1.6 Otras aplicaciones y productos obtenidos de las microalgas 27
1.6.1 Aplicaciones ambientales de las microalgas 27
1.6.2 Aplicaciones de las microalgas en la salud humana 29
1.6.3 Aplicaciones de las microalgas en acuicultura y comida animal 29

1.7 Caracterización de las microalgas enfocadas a una biorefinería integral en este estudio: *Chlorella Vulgaris* y *Schizochytrium sp. N-2* 30
1.7.1 Caracterización de la microalga *Chlorella Vulgaris* 30
1.7.2 Caracterización de la microalga *Schizochytrium sp. N-2* 33

2. Capítulo 2: Metodología 36
2.1 Modelación-simulación de procesos 36
2.1.1 Evaluación técnica 36
2.1.2 Evaluación Económica 41
2.1.3 Evaluación Ambiental 42
2.2 Evaluación experimental del crecimiento de biomasa de microalgas *Chlorella Vulgaris* y *Chlorella protothecoides* 47

3. Capítulo 3: Resultados y Discusión 50
3.1 Modelación-simulación de escenarios de procesos 50
3.1.1 Comparación Técnica de Métodos Extractivos en una Biorefinería basada en la microalga *Schizochytrium* sp. N-2 51
3.1.2 Conversión Termoquímica para la producción de energía eléctrica a partir de Biomasa de microalgas *Schizochytrium* sp. N-2. 57
3.1.3 Biorefinería a partir de cascarilla de arroz: Producción de energía eléctrica y CO_2 como sustrato para el cultivo de Microalgas 64
3.1.4 Modelación y simulación del cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris*. 69
3.1.5 Diseño de un fotoreactor para el crecimiento celular de la microalga *Chlorella Vulgaris* 76
3.1.6 Producción de biodiesel a partir de aceite de microalga *Chlorella Vulgaris*: Comparación con otras materias primas del sector productivo Colombiano. 84
3.1.7 Producción de Bioetanol a partir de pasta de microalga *Chlorella Vulgaris.* 93
3.2 Crecimiento experimental de microalgas *Chlorella Vulgaris y Chlorella protothecoides* 102

4. Conclusiones y recomendaciones 111
4.1 Conclusiones 111
4.2 Recomendaciones 114

Bibliografía 115

Lista de figuras

Pág.
Figura 2-1: Pasos ejecutados por Aspen process economic analyzer para la evaluación de procesos. 42
Figura 2-2. Categorías de impacto ambiental consideradas en este estudio a partir del software WAR GUI 46
Figura 2-3. Balance de materia y energía e impacto ambiental de un proceso químico. . 46
Figura 3-1: (a) Diagrama de flujo de extracción por ruptura celular para microalga Schizochytrium sp N-2. (b) Diagrama de flujo extracción por solventes para la microalga Schizochytrium sp N-2. (c) Diagrama de flujo de Biorefinería a aprtir de micraoalga Schizochytrium sp N-2 54
Figura 3-2: (a) Rendimientos de proceso en una Biorefinería a partir de microalga *Schizochytrium* sp. N-2. (b) Demanda Energética de Biorefinería a partir de microalga *Schizochytrium* sp. N-2. 55
Figura 3-3: Evaluación ambiental de la Biorefinería a partir de microalga *Schizochytrium* sp. N-2. 57
Figura 3-4: Procesos de Conversión de Biomasa de Microalga. (Adaptado de Brennan y Owende [28]) 58
Figura 3-5: Diagrama de flujo de proceso de producción de energía eléctrica a partir de la gasificación de biomasa de microalga *Schizochytrium* sp. N-2 61
Figura 3-6: Diagrama de flujo de proceso de producción de energía eléctrica a partir de la combustión directa de aceite de microalga *Schizochytrium* sp. N-2. 61
Figura 3-7: Diagrama de flujo de proceso de una biorefinería a partir de cascarilla de arroz 66
Figura 3-8**:** Análisis de impacto ambiental del escenario considerando todas las corrientes como residuo 67
Figura 3-9: Análisis de impacto ambiental del escenario sin considerar los productos.... 68
Figura 3-10: Diagrama de flujo de proceso de cultivo y extracción de metabolitos de microalga *Chlorella Vulgaris* 71
Figura 3-11: Distribución de costos para el cultivo de microalgas Chlorella Vulgaris 73
Figura 3-12**:** Ventajas del cultivo de microalga *Chlorella Vulgaris* a nivel agrario.*Fuente: Federación Nacional de Biocombustibles 2011 74
Figura 3-13: Análisis de impacto ambiental del cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris* 75
Figura 3-14: Modelo PSF 76
Figura 3-15: Diagrama esquemático del fotoreactor diseñado 78
Figura 3-16: Análisis de sensibilidad de la productividad de crecimiento de microalga vs altura de columna vs relación (A_{DZ} A_{LZ}^{-1}) 82

Figura 3-17: Análisis de sensibilidad de la máxima concentración de biomasa de microalga vs Altura de columna vs relación ($A_{DZ} A_{LZ}^{-1}$) 83
Figura 3-18: Perfil de concentración de biomasa de microalga 83
Figura 3-19: Isla de crecimiento óptimo para *Chlorella Vulgaris* 84
Figura 3-20: Diagrama de flujo de proceso para la producción de biodiesel usando (a) Catálisis Ácida y (b) Catálisis básica..... 86
Figura 3-21: Diagrama de flujo de proceso de un sistema de cogeneración basado en los residuos de pasta extraída. 87
Figura 3-22: Análisis de impacto ambiental para la producción de biodiesel a partir de diferentes materias primas 92
Figura 3-23: Diagrama de flujo de proceso de producción de etanol a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris*: Destilación-extractiva 99
Figura 3-24: Diagrama de flujo de proceso de producción de etanol a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris*: tamices moleculares con uso de solvente..... 99
Figura 3-25 **:** Evaluación ambiental de la producción de etanol de microalga *Chlorella vulgaris* 101
Figura 3-26: Comparación del impacto ambiental de la producción de Bioetanol a partir de maíz-caña y microalgas..... 102
Figura 3-27: Ilustración de la cámara de Neubauer 106
Figura 3-28: Representación semilogarítimica del crecimiento heterotrófico en fase exponencial de la microalga *Chlorella protothecoides* 106
Figura 3-29: Fotoreactor instalado y funcionando para la microalga *Chlorella vulgaris*. 108
Figura 3-30: Representación semilogarítmica del crecimiento exponencial de la microalga Chlorella Vulgaris en Fotoreactor 109

Lista de tablas

Pág.
Tabla 1-1: Producción de aceite a partir de diferentes fuentes.[1] 11
Tabla 1-2: Composición de ciertas algas comunes.[91] 13
Tabla 1-3: Contenido de aceite para algas comerciales con posible uso como materia prima para la producción de biodisel. [16] 14
Tabla 1-4: Contenido de almidón para algas comerciales con posible uso como materia prima para la producción de etanol. [17] 14
Tabla 1-5: Modelos para la dependencia de la velocidad específica de crecimiento de las células con respecto a la disponibilidad de luz. 16
Tabla 1-6: Comparación de cultivos abiertos y cerrados a gran escala. [93] 20
Tabla 1-7: Contenido de lípidos y productividad para diferentes especies de microalgas 31
Tabla 1-8: Composición química total de la microalga Chlorella vulgaris (% en base seca) [8] 32
Tabla 1-9: Composición bioquímica de la biomasa de Chlorella [8, 10]. 32
Tabla 1-10: Contenido de aminoácidos de Chlorella vulgaris, comparando con el patrón WHO/FAO/ONU (1985)..... 33
Tabla 1-11: Composición (%) de los ácidos grasos de la fracción lipídica extraída de *Chorella vulgaris* después de siete días de cultivo en el medio de control..... 34
Tabla 1-12: Caracterización de los ácidos grasos de alga *Schizochytrium* sp. N-2.[166] 35
Tabla 2-1. Medio de cultivo usado para el crecimiento de las microalgas *Chlorella Vulgaris y Chlorella protothecoides* 47
Tabla 3-1: Comparación del biodiesel estándar con el biodiesel obtenido. 56
Tabla 3-2: Comparación de los procesos de combustión directa y gasificación de microalga *Schizochytrium* sp. N-2..... 62
Tabla 3-3: Comparación de diferentes materias primas para la producción de energía. . 62
Tabla 3-4: Potenciales caloríficos de varias sustancias. (Tomado del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España) . 63
Tabla 3-5: Análisis último y próximo de la cascarilla de arroz en Colombia. [177] 65
Tabla 3-6: Balance de materia y energía de la biorefinería de cascarilla de arroz 66
Tabla 3-7: balances de materia y energía del cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*..... 72
Tabla 3-8: evaluación económica del cultivo y extracción de metabolitos de la microalga Chlorella vulgaris 72
Tabla 3-9: Parámetros de crecimiento de la microalga Chlorella Vulgaris [7] 81
Tabla 3-10: Resultados de la simuacion de la producción de Biodiesel usando catalizadores acido o básico 89

Tabla 3-11: Resultados de cogeneración para la extracción de residuos para el sistema de cogeneración por combustión directa de biomasa. 90
Tabla 3-12: Resultados de la Evaluación económica para la producción de biodiesel usando catalizador básico 91
Tabla 3-13: Lista de abreviaturas necesarias para la compresión del modelo SFS 97
Tabla 3-14: Parámetros estequiométricos y cinéticos del modelo SFS [191] 98
Tabla 3-15: Resumén del balance de materia y energía la producción de bioetanol de microalga 100
Tabla 3-16: Evaluación económica de la producción de bioetanol de microalgas..... 100
Tabla 3-17: Recuperación de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* mediante filtración al vacio..... 103
Tabla 3-18: Extracción de aceites con solventes y recuperación de pasta de microalga 104
Tabla 3-19: Recuperación de biomasa de microalga *Chlorella Protothecoides* mediante filtración al vacio. 105
Tabla 3-20: Extracción de biomasa C*hlorella vulgaris* mediante filtración al vacio crecida en fotoreactor 109

Introducción

El término de “ALGA” comprende un grupo muy heterogéneo de organismos vegetales marinos (50.000 aproximadamente) que se caracterizan por realizar la fotosíntesis oxigénica (fotosíntesis que produce oxígeno). Aunque la mayoría de las algas son unicelulares y microscópicas (algunas de 1 o 2 µm de diámetro), muchas son visibles como las algas marinas, la marea roja, las manchas verdeazuladas de las paredes de los acuarios, las capas verdes sobre los árboles y la nieve roja. Muchos géneros de algas tienen representantes que viven en simbiosis con hongos y forman los líquenes. [1, 2]

Los ficólogos definen a las algas como organismos fotosintéticos con Clorofila A y con estructura de talo no diferenciada en raíces, tallo u hojas como las plantas vasculares clasificándose en diversos grupos con división, destacándose: Cianobacterias (algas verde-azuladas), Euglenófitos, Dinoflagelados, Cromófitos como los Crisófitos (algas doradas) y Feófitos (algas pardas), Haptófitos, Criptófitos, Glaucófitos, Rodófitos (algas rojas) y Clorófitos (algas verdes). [2]

Dentro de las fuentes utilizadas para la obtención de aceites vegetales y almidón podemos encontrar a las algas como una fuente prometedora junto con otras materias primas de origen agroindustrial. Pero según acuerdan algunos especialistas, existe una mayor ventaja comparativa en la utilización de las algas para la producción de biodiesel, con respecto a las plantas verdes. Esta ventaja radica en la alta eficiencia fotosintética de las algas. Es así, que las pruebas de varias plantas piloto muestran que las producciones anuales de aceites a base de algas son mucho mayores, entre 2-550 veces superiores que para cualquier otro tipo de cultivo[1-3].

Las Algas, presentan además ciertas ventajas entre las que podemos citar:

- Al ser un grupo de organismos netamente acuáticos no requieren de tierra para su cultivo, y por tanto no compiten con ningún otro cultivo por un recurso limitante, la tierra. Aún si fuera necesario su cultivo sobre la tierra, este podría hacerse en zonas marginales, de ningún o escaso uso alternativo.[4]

- El agua utilizada en los cultivos de algas puede ser dulce o salada, y si es de este segundo tipo, la concentración de sales puede ser dos veces la del agua marina. Esto significa que tampoco competirían por el recurso, también limitado, del agua dulce. [5]

- Las Algas tienen una mucha mayor capacidad de absorber CO_2 con respecto a las Plantas Verdes, sin sufrir la inhibición del proceso fotosintético bajo condiciones de intensa incidencia lumínica.[6, 7]

En los últimos años, se ha venido investigando arduamente la obtención de biocombustibles a partir de materias primas que garanticen bajos costos de producción, que cumplan con la seguridad alimentaria de la población mundial, y que además, jueguen un papel importante en la mitigación de los fenómenos de impacto ambiental como la emisión de gases de efecto invernadero a la atmosfera. Muchos autores y estudios ([1],[8], [9], [10], [11], [12], [13],[14], [15], [16], [17], [18], [19], [20] entre otros) se han enfocado hacia las microalgas como una fuente prometedora de energía alternativa que gracias a sus características metabólicas llevan a incrementar esfuerzos en cuanto a la búsqueda de alternativas de crecimiento y cultivo, recolección, extracción y procesamiento de productos intracelulares de alto valor agregado.

Las materias primas para producir biocombustibles han evolucionado desde primera generación (cultivos agrícolas)[21, 22], segunda generación

(residuos)[22, 23] hasta tercera generación (algas)[24, 25], debido a que se busca no atentar contra la seguridad alimentaria del mundo y la tierra. Existen muchos trabajos que investigan las algas, pero a su vez, la gran mayoría de estos son experimentales y no presentan una proyección hacia la industria en aspectos como competición con materias primas convencionales, la calidad del biocombustible, impacto ambiental y social en el contexto colombiano y mundial.

La finalidad de este trabajo de tesis es estudiar la producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas ricas en aceite y almidón a bajo costo, sin atentar con la tierra cultivable para alimentos y buscando ser amigable con el ambiente. Para ello se optó por evaluar las microalgas ***Chlorella Vulgaris*** debido a su composición equilibrada de lípidos y carbohidratos que visualiza una biorefinería sostenible de producción de biocombustibles y otros metabolitos y ***Schizochytrium* sp. N-2** debido a su alta cantidad de ácidos grasos orientados a la producción de aceites finos de alto valor agregado como los aceites tipo omega [26]. A lo largo de esta tesis se muestran técnicas de cultivo de biomasa de microalgas en sistemas abiertos y cerrados, métodos de recolección, extracción de metabolitos y caminos para la obtención de etanol y biodiesel. Se busca evaluar y validar la proyección industrial vía modelación y simulación del proceso. Se estudia su impacto económico, ambiental y social, además de examinar a nivel experimental el cultivo de biomasa de microalga en sistemas adecuados a las necesidades de monitoreo y en sistemas cerrados como fotoreactor.

Hipótesis

Es posible obtener Biodiesel y Bioetanol de manera eficiente a partir de algas cultivadas a nivel de laboratorio en sistema abierto y sistema cerrado tipo fotoreactor.

Objetivo General

Analizar desde el punto de vista técnico, económico y ambiental la producción de Biodiesel y Bioetanol a partir del cultivo de microalgas en medio abierto y cerrado.

Objetivos Específicos

- Evaluación experimental del crecimiento de biomasa de algas en sistemas Heterotróficos y Autotróficos (Tipo Fotoreactor).
- Modelación y simulación de los procesos de extracción de metabolitos transformables a biocombustibles a partir de microalgas.
- Modelación y simulación de la producción de alcohol carburante a partir de microalgas aptas y ricas en azucares reductores.
- Modelación y simulación de la producción de biodiesel a partir de microalgas ricas en aceite.
- Evaluación tecno-económica de las alternativas para la producción de biocombustible de tercera generación (algas) tomando como base el contexto colombiano.
- Evaluación de materias primas para la producción de Microalgas. Caso: Cascarilla de Arroz.
- Modelación y Diseño de un Fotorreactor.

1. Capítulo 1: Generalidades de la producción de biocombustibles a partir de microalgas

Las microalgas podrían convertirse muy pronto en la materia prima para biodiesel más efectiva, por encima de la mayoría de cultivos energéticos tradicionales. De hecho, ya son muchas las personas que lo han corroborado, tanto científicos e investigadores con muchos años de indagación en el tema, como empresarios que comienzan a disfrutar de su rentabilidad.[13, 27, 28]

En promedio, la biomasa de microalgas está constituida por 20-30% de lípidos, de 40-50% de proteínas y de la parte restante subdividida entre los carbohidratos, que en algunas especies pueden llegar hasta el 55% de la biomasa, y otros compuestos de importancia menor[9, 29]. Se constituyen así en el producto del más eficiente estado de producción de biomasa en el ciclo de la naturaleza, siendo reconocidas como un excelente recurso medioambiental y biotecnológico entre los microorganismos por varias razones:

- En contraste con la mayoría de las bacterias y el total de los hongos y levaduras, las microalgas por su capacidad fotosintética pueden alcanzar grandes rendimientos solamente con energía solar adecuada y una fuente de carbono como el CO_2 o bicarbonatos, además de nutrientes de fácil disponibilidad.[6, 30, 31]

- Algunas especies están también en condición de crecer sobre sustrato orgánico, en presencia o ausencia de luz [32, 33]. La capacidad de estos microorganismos de poder crecer en ambientes diferentes y adversos a muchos

otros organismos vegetales, es debido a la variedad excepcional de lípidos y de otros compuestos inusuales, que están en condiciones de sintetizar.[33, 34]

- Entre los distintos grupos de organismos fotosintéticos, las microalgas resultan ser uno de los más eficientes en utilizar la energía solar. Por lo general, las plantas superiores presentan una eficiencia fotosintética alrededor del 2% o también menos. Las microalgas, gracias a su simplicidad estructural tienen una eficacia fotosintética claramente superior y según las condiciones ambientales y de cultivo, pueden alcanzar hasta 4-8%. [35, 36]

- Las microalgas son convertidores mucho más eficientes de la energía solar que cualquier planta terrestre conocida, porque crecen en la suspensión donde tienen el acceso ilimitado al agua y acceso más eficiente al CO_2 y a los nutrientes.[37-39]

- De importancia particular es que las microalgas pueden ser cultivadas todo el año, y cosechadas continuamente.[23, 40-42]

- Pueden crecer en tierras marginales en las regiones áridas del mundo, en ambientes salinos e hipersalinos de baja calidad o en aguas residuales cargadas de nutrientes, que no son buenas para la irrigación agrícola o el consumo para los seres humanos o los animales[8, 43-45].De esta manera, los cultivos de microalgas no compiten con la agricultura tradicional por cantidad o calidad de suelos.[46-48]

- Los cultivos algales también tienen un consumo de agua más baja que la requerida por los cultivos tradicionales[49-51]. Si uno considera que el agua usada se puede utilizar luego para la irrigación, los cultivos algales son aún más ventajosos.[51-54]

- Las microalgas crecen al igual que las bacterias, es decir, de manera exponencial. Es un crecimiento muy rápido, ningún vegetal terrestre da un crecimiento de ese tipo. Las plantas necesitan un tiempo más prolongado.[34, 48, 55]

- Por ser organismos unicelulares, su biomasa entera posee los productos de interés, a diferencia de las plantas superiores en las que los productos recuperables se encuentran en sitios u órganos específicos, lo que dificulta su extracción. Debido a esto, la inducción fisiológica para la producción de compuestos de interés comercial como proteínas, lípidos, glicerol, pigmentos, enzimas y biopolímeros es fácilmente realizable.[56-59]

- Otra ventaja que tienen las microalgas es que su cultivo no requiere el uso de los pesticidas y herbicidas que deben usarse con los vegetales terrestres para alejar plagas [60-62]. Reconociendo estas valiosas propiedades, se iniciaron diferentes líneas en el campo de la investigación aplicada de microalgas, desde la década del 40 y que estuvieron influenciadas por factores socioeconómicos de cada época [13, 63-65]. Ambientalmente hablando, se trata de una fuente de producción de energía en continuo, inagotable y no contaminante porque no moviliza carbono fósil, si no que utiliza el exceso de carbono (CO_2)[66, 67]. Contribuye de esta forma a contrarrestar el efecto invernadero y a restablecer el equilibrio térmico del planeta [68-70]. En la Tabla 1-1 se señalan algunos niveles de producción anual de volumen de aceite por m^2.

El biodiesel es un biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, con o sin uso previo, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación, y que se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiésel o gasóleo obtenido del petróleo. El biodiesel a partir de aceite de microalgas se produce por procesos como la transesterificación usando una base como catalizador debido a que es el método más económico, requiriendo bajas temperaturas y presiones y obteniendo una conversión del 98%.

Sin embargo, hay otros métodos que usan ácidos como catalizadores que son más lentos.[1, 2, 71].

Algunas características y ventajas del biodiesel producido a partir de algas son las siguientes:

- Las algas tienden a producir una alta cantidad de ácidos grasos poli insaturados, lo que disminuye la estabilizad del biodiesel. Pero los ácidos grasos poli insaturados tienen puntos de fusión bajos por lo que en climas fríos es mucho más ventajoso que otros tipos de biocombustibles.[11, 45, 72, 73]

- La producción de aceites a partir de algas es 200 veces mayor que en plantas. Por lo que también es mayor la producción de biodiesel.[13, 14, 74-76]

- Posee un alto rendimiento y por lo tanto un bajo costo. [1, 2, 77]

- La producción de biodiesel de algas tiene las características de reducir las emisiones de CO_2 y compuestos nitrogenados de la atmosfera.[78]

- El uso de algas ricas en azucares, de manera análoga a la producción de biodiesel conllevan a la producción de etanol mediante un proceso de fermentación, dicho etanol es el usado como aditivo de la gasolina. [17, 43, 79, 80]

Las algas están compuestas básicamente por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleídos y ácidos grasos [48, 81, 82]. Los ácidos grasos se encuentran en las membranas, en los productos de almacenamiento, metabolitos, etc. En la tabla 1-2 se puede observar la composición típica de ciertas algas comunes. El porcentaje de ácidos grasos varía según la especie, aunque hay especies cuyos ácidos grasos representan 40% de su peso en base seca [42, 54, 83, 84]. Estos son los ácidos grasos que luego son convertidos en biodiesel. Para la producción

de estos se buscan algas que contengan un alto contenido en lípido y que sean fácilmente cultivables [85-87].

Tabla 1-1: Producción de aceite a partir de diferentes fuentes.[1]

Fuente	**Rendimiento de Aceite (L/ha)**	**Área necesaria de Cultivo (M ha)[c]**
Maíz	172	1540
Soya	446	594
Canola	1190	223
Jatrofa	1892	140
Coco	2689	99
Aceite de Palma	5950	45
Microalga[a]	136900	2
Microalga[b]	58700	4.5

a. 70% en peso de aceite en la biomasa
b. 30% en peso de aceite en la biomasa
c. Para solventar el 50% del combustible necesario para el transporte en USA.

En Estados Unidos se puso en marcha un programa que duró desde 1978 a 1996, llamado “The Aquatic Species Program”, cuyo objetivo fue investigar acerca de cuáles serian las especies de algas más apropiadas para la producción de biocombustibles. Este programa llego a la conclusión de que no hay una cepa o una especie de alga que sea la mejor en términos de su composición bioquímica y pigmentación. Existen alrededor de mil especies conocidas, y se encuentran principalmente en sistemas de aguas continentales que producen y almacenan aceites naturales y carbohidratos.[87-90]

En la Tabla 1-3 y Tabla 1-4 se pueden observar el porcentaje de aceites y almidón en ciertos tipos de algas comerciales para la producción de biodiesel y etanol respectivamente. Para la producción de biodiesel con microalgas se debe contar con los siguientes suministros para su mantenimiento:

- **Agua**. Para que los cultivos mencionados existan, es necesario contar con grandes volúmenes de agua, para el crecimiento y producción de aceite. Las fuentes de agua pueden ser: aguas salinas provenientes del mar, aguas dulces (ríos, lagos u otros) o aguas residuales provenientes del sector agropecuario. En caso de aguas residuales, las cuales poseen nitrógeno y fosforo el aporte de nutrientes es menor. [91, 92]

- **Nutrientes**. Para la producción de biomasa de microalgas es necesario tener en cuenta el tipo de alga utilizado debido a que tienen diferente comportamiento acorde a los tipos de nutrientes. Cuando se utiliza el método de cultivo de micro algas por medio de la masificación, se prepara un medio donde las microalgas puedan alcanzar su máximo rendimiento productivo. Uno de los medios de cultivo universalmente más utilizados es el F/2 de GUILLARD'S que ha demostrado ser eficiente para el crecimiento de un gran número de micro algas, pero que demanda la utilización de una gran cantidad de nutrientes. [91, 93, 94]

- **Dióxido de carbono.** Los cultivos de microalgas tienen la capacidad para utilizar altos volúmenes de CO_2 provenientes de procesos industriales y de generación de energía eléctrica. Los estanques para el cultivo de estas algas pueden ser altamente eficientes en la utilización de este gas, hasta 90% o más del CO_2 inyectado en los estanques es utilizado de manera eficaz por los microorganismos. [18, 51]

- **Luz.** Para un crecimiento adecuado de la biomasa microalgal autotróficamente, se hace necesario una fuente de luz que garantice una adecuada función metabólica de los microorganismos. Dicha fuente de luz puede ser de la luz solar en un día común o de una fuente externa (lámparas, Led's entre otros) cuidando que la iluminación no sature la microalga y se produzca daño fotoquímico. [95, 96]

Tabla 1-2: Composición de ciertas algas comunes.[97]

Por 100 g de alga seca	Wakame	Dulse	Sea Spaghetti	Kombu	Nori	Agar Agar	Island Moss	Fucus
Proteínas %	22.7	18	8.4	6.9	29	0.6	20.5	7.5
Lípidos %	1.5	2	1.1	1.1	0.3	0.1	2.7	1.9
Glúcidos %	46.8	56	44.1	52.1	43.1	70	68.3	46.8
Fibra %	35.3	2.5	32.7	30	34.7	70	34.2	50
Calcio (mg)	1380	560	720	750	330	325	1120	725
Hierro (mg)	20	50	59	165	23	2.2	17	11
Magnesio (mg)	680	610	435	715	370	159	600	670
Fósforo (mg)	235	235	240	165	235	20.7	135	315
Yodo (mg)	22.6	55	14.7	15.9	17.3	-	24.5	14.5
Potasio (mg)	6810	7310	8250	4330	2030	41.6	1350	2500
Sodio (mg)	4880	1595	4100	2620	940	640	1200	2450
Selenio (mg)	590	17	220	310	600	-	200	250
Viramina A (mg)	0.04	1.59	0.07	0.04	3.6	-	-	0.3
Vitamina B1 (mg)	0.17	1.56	0.02	0.05	0.14	-	-	0.2
Vitamina B12 mg	0.23	0.51	0.02	0.21	0.36	-	-	0.03
Vitamina C mg	5.29	34.5	28.5	0.35	4.2	-	-	14.1

1.1 Cultivo de biomasa de algas.

Las microalgas son adaptadas para recoger recursos de su medio ambiente, almacenarlos, o incrementar su eficiencia en su reutilización. Existen tres grandes

condiciones de cultivo de las microalgas: fotoautótrofos, heterótrofos, mixotróficos.[9, 98, 99]

Las algas son capaces de crecer en un amplio rango de condiciones por la que se las encuentra en cualquier zona del planeta: dentro de plantas acuáticas, sobre sustrato artificial como madera o botellas, en lagunas, ciénagas, pantanos, nieve, lagos de agua dulce o salina, sobre rocas, etc. Por lo que no es difícil encontrar zonas para cultivarlas. [2, 41, 96, 100, 101]

Tabla 1-3: Contenido de aceite para algas comerciales con posible uso como materia prima para la producción de biodiesel. [16]

Microalga	**Contenido de Aceite (% masa en base seca)**
Botryococcus braunii	25-77
Chlorella sp.	28-32
Crypthecodinium cohnii	20
Dunaliella primolecta	16-37
Isochrysis sp.	25-33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20-35
Nannochloropsis sp.	31-68
Neochloris oleoabundans	35-54
Nitzschia sp.	45-47
Phaeodactylum tricornutum	20-30
Schizochytrium sp.	50-77
Tetraselmis sueica	15-23

Encontrar cepas de algas para hacerlas crecer no es difícil, pero es complicado encontrar cepas que permitan la producción de biodiesel debido a que este tipo de algas necesitan de un alto mantenimiento y por otro lado se contaminan fácilmente con otras especies. [9, 41, 101, 102]

En un sistema optimo, sin factores limitantes, la disponibilidad de luz determina la velocidad de fotosíntesis y la productividad. Igualmente, es importante tener en cuenta

que la excesiva presencia de luz puede resultar perjudicial para el cultivo y conllevar a la llamada fotoinhibición [103, 104]. En estado estable, la tasa de dilución es igual a la velocidad especifica de crecimiento (μ) la cual es dependiente directamente de la cantidad de luz, el factor controlante del sistema; la dependencia de μ con respecto al rango de irradiación ha sido expresada de diferentes maneras, que se encuentran resumidas en la tabla 1-5, generalmente μ incrementa con el incremento de la irradiación encontrando un valor máximo denominado μ_{max}. Si continua el incremento de la irradiación se puede presentar el fenómeno de inhibición por excesiva cantidad de luz presente.[105]

Tabla 1-4: Contenido de almidón para algas comerciales con posible uso como materia prima para la producción de etanol. [17]

Alga	**% de almidón del aceite extraído de alga (base seca)**
Saccharina latissima	Aprox. 50
Green alga NKG 121701	>50
Chlamydomonas reinhardtii UTEX 90	53.0
C. reinhardtii (UTEX2247)	45
Chlorella Vulgaris	12-37
Chlorococcum sp. TISTR8583	26
Scenedesmus sp. TISTR 8579	20.4
S. acutus TISTR 8447	18.6
S. obliquus TISTR 8522	23.7
Nostoc sp. TISTR 887	30.7
Nostoc sp. TISTR 8873	32.9
N. maculiforme TISTR 8406	30.1
N. muscorum TISTR 8871	33.5
N. paludosum TISTR 8978	32.1
Oscillatoria sp. TISTR 8869	19.3
Phormidium angustissimum TISTR 8979	28.5
Spirulina fusiformis	37.3-56.1

1.1.1 Cultivos Fototróficos

Un cultivo fototrófico ocurre cuando las microalgas utilizan luz, tal como la luz del sol, como recurso energético, y carbón inorgánico (dióxido de carbono) como fuente de carbón para formar energía química a través de la fotosíntesis. Esta es la condición de cultivo más comúnmente usada para el crecimiento de microalgas[3, 52, 106, 107]. En cultivos fototróficos existe una gran variación en el contenido de lípidos en las

microalgas, los cuales van desde el 5% a 68%, dependiendo del tipo de especie de microalgas, normalmente una limitación de nitrógeno o nutrientes se usó para aumentar el contenido de lípidos en las microalgas [61, 72, 108]. La principal ventaja de utilizar cultivos autotróficos para la producción de aceite de microalgas es el consumo de dióxido de carbono como fuente de carbono para producir un crecimiento celular y aceite. [29, 109, 110]

1.1.2 Cultivos Heterotróficos

Utilizan solo componentes orgánicos como fuente de carbón y energía. Algunas especies de microorganismos no pueden crecer solo bajo condiciones fototróficas, sino también el uso de carbón orgánico bajo condiciones de oscuridad, como las bacterias. En la situación cuando una microalga usa carbón orgánico como fuente de energía y carbón es llamado cultivación heterotrófica. Este tipo de cultivo podría evitar los problemas asociados con la limitación de luz que entorpecen la alta densidad de células en los grandes fotobioreactores en cultivos fototróficos. Algunas especies de microalgas tiene un contenido más alto de lípidos durante del crecimiento heterótrofo y un 40% en contenido de lípidos se obtiene al someter un cultivo a condiciones heterotróficas en vez de fototróficas para algas como la *Chlorella protothecoides*.[14, 43, 73, 111, 112]

1.1.3 Cultivos Mixotróficos

Realizan la fotosíntesis como principal fuente energética. Las microalgas son capaces de vivir en cualquier condición ya sea heterotróficamente o fototróficamente dependiendo de la concentración de componentes orgánicos e intensidad de luz presente en el medio. Este tipo de cultivo comparado con los heterótrofos y fototróficos es raramente utilizado en la producción de aceite de microalga [113].

1.1.4 Cultivos Fotoheterotróficos

En este cultivo la microalga requiere de luz cuando necesita componentes como fuentes de carbono. La principal diferencia entre cultivos mixotroficos y fotoheterotrofos es que estos últimos requieren de luz como fuente de energía mientras que los mixotroficos pueden utilizar componentes orgánicos para el mismo propósito. Por lo tanto este tipo de cultivo necesita de luz y azucares al mismo tiempo no obstante la producción de algunos

metabolitos útiles puede ser mejorada mediante el uso de cultivos fotoheterotrofos, la utilización de este tipo de cultivo para la producción de biodiesel es muy rara así como en el caso de los cultivos mixotroficos.[114]

Tabla 1-5: Modelos para la dependencia de la velocidad específica de crecimiento de las células con respecto a la disponibilidad de luz [95].

Ecuación	Autores
$\mu = \frac{\alpha\, \mu_{\max}\, I}{\mu_{\max} + \alpha I}$ (1)	Tamiya
$\mu = \mu_{\max}\left(1 - e^{-\frac{I}{I_{\max}}}\right)$ (2)	Van Oorschot
$\mu = \frac{\mu_{\max}\, I}{I_{\max}}\left(1 - e^{-\frac{I}{I_{\max}}}\right)$ (3)	Steele
$\mu = \frac{\mu_{\max}\, I}{\left(K_t^m + I^m\right)^{\frac{1}{m}}}$ (4)	Bannister
$\mu = \frac{\mu_{\max}\, I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_t}}$ (5)	Aiba
$\mu = \frac{\mu_{\max}\, I^n}{I_k^n + I^n}$ (6)	Molina Grima

Donde **μ** es la tasa de velocidad específica de crecimiento, $\boldsymbol{\mu_{max}}$ es la tasa máxima de velocidad específica de crecimiento, **I** es la intensidad de luz irradiada, $\mathbf{I_{max}}$ es la máxima intensidad de luz irradiada, **n, m, y α** son párametros experimentales que dependen del tipo de microalga.

1.2 Sistema de Cultivo y crecimiento de biomasa de algas.

Se distinguen dos tipos de sistemas de cultivos: los sistemas abiertos tipo piscinas y los sistemas cerrados tipo fotoreactor, biorreactor e invernaderos. En la Tabla 1-6 se puede visualizar una comparación de ambas tecnologías de cultivo.

1.2.1 Sistemas Abiertos

Debido a que las algas necesitan de luz solar, CO_2 y agua para crecer, pueden ser cultivadas en estanques y lagos. A estos tipos de cultivos se los llaman “sistemas abiertos”. Son normalmente menos costosos en lo que refiere a su construcción y operación, más duradero que los reactores cerrados y con una capacidad de producción más amplia cuando se compara con sistemas cerrados [9, 98]. Sin embargo, los tanques utilizan más energía para homogenizar los nutrientes [32, 54, 99, 115]. Generalmente estos tanques son más susceptibles a las condiciones ambientales, lo que no permite el control de la temperatura del agua, evaporación e iluminación [107, 116]. Este tipo de sistema produce una gran cantidad de microalgas, pero ocupa grandes áreas y por lo tanto es más susceptible a contaminación de otras microalgas o bacterias. Por otra parte ya que la atmosfera solo contiene 0.03-0.06% CO_2 es de esperarse que la transferencia de masa sea limitada lo cual puede disminuir el crecimiento celular [117]. El riesgo de este tipo de sistemas de cultivos es la alta probabilidad de ser contaminados por otros tipos de algas, ya que las algas que tienen el mayor componente en aceite no necesariamente son las que más rápido crecen, por lo que algunas cepas de algas contaminantes podrían invadir masivamente el cultivo. Por otro lado en este sistema se tiene poco control frente a condiciones ambientales tales como temperatura del agua, CO_2, intensidad lumínica, entre otros, por lo que el crecimiento del cultivo depende de las condiciones del medio y en general se produce en los meses más cálidos [95, 118]. En general, para el cultivo en sistemas abiertos se buscan cepas que puedan crecer bajo condiciones en las que otros organismos les resultaría difícil desarrollarse como pH altos o bajos, temperaturas específicas, requerimientos nutritivos específicos, etc. Es por esta razón que solo pocas especies fueron cultivadas con éxito en este tipo de sistemas. La ventaja que tienen los sistemas abiertos es que son muy baratos y fáciles de construir ya que básicamente lo que se hace es construir estanques [35, 37, 38, 92, 119].

1.2.2 Sistemas Cerrados

Un sistema alternativo para el crecimiento de algas es mediante invernaderos, también en estanque. Aunque se reduce el área de cultivo se solucionan muchos problemas que poseen los sistemas abiertos: menor probabilidad de contaminación por especies no deseadas, pueden cultivarse un mayor número de especies, el periodo de cultivo es

mayor ya que hay control de la temperatura y puede incrementarse la cantidad de CO_2 en el ambiente, con lo que también aumentaría la tasa de crecimiento de las algas. [3, 31, 96]

Los estanques poseen sistemas que permiten a las algas mantenerse en movimiento en el medio, de forma que todas reciban la misma cantidad de luz y nutrientes. Por otro lado se renueva continuamente la cantidad de CO_2 y nutrientes del medio. [15]

Otro tipo de sistemas cerrados de cultivos son los fotobiorreactores, los cuales son sistemas flexibles que pueden ser optimizados de acuerdo con las características biológicas y fisiológicas de las algas cultivadas lo cual permite cultivar algas que no pueden crecer en campos abiertos. Comunmente se utilizan fotobiorreactores diseñados como reactores tubulares de lecho empacado (PBR de su sigla en inglés) en los cuales el cambio directo de gases contaminantes entre el cultivo y la atmosfera es limitado o no es permitido y también una gran proporción de luz no invade directamente sobre la superficie ya que tiene que atravesar las paredes transparentes del reactor [92, 105, 120-122]. Dependiendo de su forma o diseño este tipo de reactores ofrecen mejor control sobre las condiciones del cultivo y los parámetros de crecimiento (pH, temperatura, mezclado, CO_2 y O_2), prevenir la evaporación, reduce las pérdidas de CO_2, permite obtener una alta densidad de microalgas, y una mayor productividad volumétrica [15, 31, 52, 96, 98, 102, 104, 105, 120, 123, 124]

1.3 Esquemas de recuperación de biomasa de microalgas.

Las microalgas tienen un rápido aumento en su masa celular en 24 horas y alcanzan una fase exponencial cerca de 3.5 h alcanzando contenidos en aceite aproximadamente mayores al 80% en peso en base seca [1, 18, 71, 125].

Posterior al crecimiento de la biomasa del alga, el reto es la extracción de los metabolitos que tienen importancia a nivel industrial, por ende, se hace de suma importancia, entender las tecnologías para el cultivo, extracción y purificación del aceite crudo.

El cultivo y recolección de la biomasa de alga requiere de diversos pasos de separación solido-liquido. La recolección eficiente de la biomasa a partir del caldo de cultivo es

esencial para la producción masiva de biodiesel a partir de microalgas[24, 86, 90]. Las principales técnicas aplicadas actualmente en la recolección de microalgas incluyen la centrifugación, floculación, filtración y cribado, sedimentación por gravedad, flotación, y las técnicas de electroforesis [28, 71, 77, 90]. El costo de la recolección de algas puede ser alto, ya que las fracciones de masa en caldo de cultivo son generalmente bajas, La selección de la técnica de la cosecha depende de las propiedades de las microalgas, como la densidad, el tamaño y el valor de los productos deseados. La recolección de microalgas en general, se puede dividir en un proceso de dos etapas:

- **Cosecha en masa:** el propósito es separar las microalgas de la biomasa suspendida. Por este método, el sólido total puede alcanzar de 2-7% usando floculación, flotación, o centrifugación gravitatoria.[126]

- **Espesamiento:** El propósito de esta cosecha es concentrar el lodo, con filtración y centrifugación usualmente aplicada en este proceso. Este paso necesita más energía que una cosecha en masa [127].

Usualmente, procesos de centrifugación, filtración, sedimentación y floculación-coagulación son empleados, dependiendo del diámetro de partícula de las células de alga que oscila entre (3-30 µm).[28, 71]

Tabla 1-6: Comparación de cultivos abiertos y cerrados a gran escala. [99]

Sistemas para el cultivo de microalgas	Sistemas cerrados (PBRs)	Sistemas abiertos (Tanques)
Control de contaminación	Fácil	Difícil
Riesgo de contaminación	Reducido	Alto
Esterilidad	Realizable	Ninguna
Control del proceso	Fácil	Difícil
Control de especies	Fácil	Difícil
Mezclado	Uniforme	Muy pobre
Régimen de operación	Batch o semi-continuo	Batch o semi-continuo
Espacio requerido	Según la productividad	Según la productividad
Relación área/volumen	Alta (20-200 m^{-1})	Baja (5-10 m^{-1})
Densidad celular	Alta	Baja
Inversión	Alta	Baja
Costos de operación	Altos	Baja
Tanques: Capital/Costos de operación	Los tanques con de 3-10 veces menos costosos.	PBRs > Tanques
Eficiencia de utilización de la luz	Alta	Pobre
Control de temperatura	Temperatura más uniforme	Difícil
Productividad	3-5 veces más productiva	Baja
Perdida de agua	Depende del diseño de enfriamiento	Depende del diseño
Estrés hidrodinámico de las algas	Bajo-Alto	Muy bajo
Evaporación del medio de cultivo	Baja	Alto
Control de la transferencia de gases	Alta	Baja
Perdida de $\boldsymbol{CO_2}$	Depende del pH, alcalinidad etc.	Depende de pH, alcaldía etc.
Inhibición de $\boldsymbol{O_2}$	Mayor problema en los PBRs	PBRs > Tanques
Concentración de la biomasa	3-5 veces en los PBRs	PBRs > Tanques
Escalamiento	Difícil	Difícil

1.3.1 Filtración

Los filtros prensa operan bajo presión o al vacío y pueden ser usados para recobrar una gran cantidad de biomasa, pero para algunas aplicaciones el filtrado puede ser relativamente lento lo cual es insatisfactorio. El filtrado puede ser adecuado para grandes microalgas tales como *Coelastrum proboscideum* y *S. platensis* pero no para recobrar organismos con dimensiones más pequeñas tales como *Scenedesmus*, *Dunaliella*, o *Chlorella* [128]. Alternativamente membranas de microfiltración y ultra-filtración son ahora una posible alternativa a la filtración convencional para recobrar algas, las cuales son más adecuadas para células frágiles y pequeños procesos de producción. Sin embargo, estos procesos de filtración son más costosos especialmente porque se necesita membranas y sustituir el bombeo [49]. Una concentración alta de microalgas puede resultar en el bloqueo de la pantalla de selección, mientras que la concentración de microalgas baja puede resultar en la captura de ineficiente [28].

1.3.2 Floculación-Coagulación

Suele ser una operación previa a la centrifugación, la filtración y especialmente de la sedimentación por gravedad para la recolección de la biomasa del caldo de cultivo. Las microalgas suelen llevar cargas negativas que previenen su agregación en suspensión. Dicha superficie cargada puede ser neutralizada o reducida por la adición de un floculante adecuado al caldo, barato, no toxico y efectivo a bajas concentraciones. Sales metálicas multivalentes como cloruro férrico ($FeCl_3$), sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$) y sulfato férrico ($Fe_2(SO_4)_3$) suelen ser usados. El aluminio es efectivo para algas como *Scenedesmus y Chlorella* [116]. Es válido aclarar, que el uso de floculantes metálicos suele ser muy poco recomendable si la biomasa recolectada tiene fines alimenticios. Quitonaso, un polímero de acetilglucosamida, ha probado ser un floculante no toxico y optimo para varios tipos de algas, como *Tetraselmis chui, Thalassiosira pseudonana y Isochrysis sp.* La ventaja de este, es su fácil fabricación y bajas dosis para una efectiva floculación, aunque, dicha efectividad se ve reducida en agua salina. Otras veces, la floculación puede llevarse a cabo simplemente por el cambio del pH del caldo de cultivo siendo efectiva a pH de 11.8 a 12 [71, 128].

1.3.3 Centrifugación

Es uno de los métodos más rápidos, fáciles y de mayor consumo de energía dependiendo del volumen de proceso para cultivar algas. La pasta de algas tradicionalmente obtenida contiene 90% en peso de agua dependiendo de las características del alga, el tiempo de residencia siendo el último controlado con la tasa de flujo [37, 129, 130].

La recolección de la biomasa puede llegar a representar entre el 20-30% del costo total de la producción. Un proceso posterior a la recolección suele ser necesario debido a la gran cantidad de agua presenta en la pasta obtenida, y es una dehidratación que suele hacerse mediante un secado al sol, cuyos inconvenientes como contaminación, largos tiempos de exposición, perdida de las propiedades de la biomasa son asociados; secado por aspersión, liofilización, y secado en lecho fluidizado pueden ser aplicados pero su costo aumenta considerablemente en el proceso [28]. Debido que para una optima extracción de los metabolitos del aceite de alga, se requiere una cantidad de agua en la biomasa de máximo 50% en peso, se hace necesario integrar energéticamente el proceso para aprovechar el calor perdido en la planta [66, 71].

1.3.4 Sedimentación por gravedad

Es comúnmente aplicada para separar microalgas en agua y tratar deshechos en agua. La densidad y radio de las algas induce a la sedimentación influenciada por el asentamiento característico de los sólidos suspendidos. Una mejora para la recolección de microalgas por sedimentación puede realizarse a través de laminillas separadoras y tanques de sedimentación. La floculación es frecuentemente usada para aumentar la eficiencia de la sedimentación por gravedad. El éxito de remover sólidos por sedimentación por gravedad depende de la alta densidad de las partículas de las microalgas [109].

1.3.5 Flotación

Es un proceso de separación por gravedad en el cual se agrega burbujas de aire y gas a las partículas sólidas las cuales son llevadas a la superficie del líquido. La flotación es más beneficiosa y efectiva que la sedimentación con respecto a la remoción de

microalgas. La flotación puede capturar partículas con un diámetro menor a 500 μm por la colisión entre la partícula y la burbuja y en consecuencia la adhesión de la burbuja a la partícula. Basado en el tamaño de la burbuja utilizada en el proceso de flotación, el proceso se puede dividir en flotación por aire disuelto, flotación por dispersión y flotación electrolítica [131].

- **Flotación por aire disuelto (DAF):** Supone la reducción de la presión de una corriente de agua que es presurizada con aire a alta presión para producir burbujas de10-100 μm **.** Factores que determinan la cosecha DAF de microalgas incluyen la presión del tanque, la tasa de reciclaje, tiempo de retención hidráulica y flotación de partículas. La floculación química ha sido usada con DAF para separar microalgas [45, 86, 131].

- **Floculación de aire dispersado:** implica burbujas de 700-1500 μm formadas por un agitador de alta velocidad mecánica con un sistema de inyección de aire [131].

1.3.6 Electroforesis

El método electrolítico es otro método para separar las algas sin necesidad de agregar componentes químicos. En este método un campo cargado eléctricamente conduce el alga a hace la superficie de la solución. La hidrolisis del agua genera hidrogeno el cual se adhiere a los flóculos de las microalgas y les lleva a la superficie. Hay varias ventajas al usar métodos electroquímicos, incluida la compatibilidad ambiental, versatilidad, eficiencia energética, la seguridad, la selectividad, y la rentabilidad [103].

1.3.7 Secado o deshidratación

La biomasa cosechada es un producto perecedero y debe tratarse con rapidez después de la cosecha, la deshidratación o secado se suele utilizar para ampliar la viabilidad en función del producto final requerido. Los métodos que han sido utilizados son el secado al sol [132, 133], el secado por aspersión [134, 135], tambor de secado, en lecho fluido de secado [136], liofilización [137] entre otras.

El secado al sol es el método más barato, pero las principales desventajas son los largos tiempos de secado, necesidad de grandes superficies, y el riesgo de pérdida de material

[135]. El secado por aspersión es comúnmente utilizado para la extracción de productos de alto valor, pero es relativamente caro y puede causar un deterioro significativo de algunos pigmentos de algas [137]. La liofilización es igualmente costosa, especialmente para las operaciones a gran escala, pero facilita la extracción de aceites. Los elementos intracelulares, como los aceites son difíciles de extraer de la biomasa húmeda con disolventes sin interrupción de la célula, pero se extraen más fácilmente de la biomasa liofilizada [71].

1.4 Procesamiento de la biomasa de microalga y recuperación de metabolitos

La pasta de alga con un contenido de humedad de aproximadamente 50% en peso se somete a un proceso de extracción de metabolitos vía lisis celular o con solvente de los ácidos grasos en el interior del alga. Comúnmente se utilizan técnicas de ruptura celular con homogenizadores de alta presión o lisis alcalina, acida o enzimática, o técnicas de extracción con solvente utilizando hexano, etanol, dimetil éter, cloroformo y fluidos supercríticos [128, 138-140].

La ruptura celular es muchas veces necesaria para recuperar productos intracelulares del alga. Muchas técnicas desarrolladas para romper células de organismos no fotosintéticos son aplicables a algas. La homogenización a alta presión es un proceso utilizado para el rompimiento celular a gran escala en donde, con una bomba de alimentación se transporta la biomasa de alga a la bomba de pistón de alta presión donde es comprimida hasta 600 bar. La válvula se abre cuando la presión excede cierto valor. La suspensión es liberada a gran velocidad y choca contra un anillo de impacto. En la válvula las células se someten a turbulencia, cavitación y esfuerzos de corte líquido. La fuerza del choque sobre el anillo es la causa principal del rompimiento. Este método ha sido utilizado para romper células de *Scenedesmus obliquus, S. platensis and Monodus subterraneous* [71, 141].

La extracción con solvente ha sido ampliamente utilizada para extraer metabolitos como β-caroteno y ácidos grasos esenciales como EPA, DHA, acido α-linolenico, acido araquidonico entre otros utilizando como solventes hexano, etanol, dimetil éter y cloroformo [90, 142].

Adicionalmente a este proceso de recuperación, los metabolitos extraídos junto con la biomasa residual se filtran y se someten a una separación cromatográfica entre las que se destacan la cromatografía en fase reversa, cromatografía de adsorción en gel de sílica y cromatografía en gel de sílica argentada [71, 138, 140, 141, 143].

1.5 Obtención de Biodiesel y alcohol carburante a partir de microalgas

Las microalgas contienen aceites que pueden ser convertidos en biodiesel. La idea de usar estos microorganismos para producir este combustible no es nueva, pero actualmente a renovado interés en torno a la búsqueda de energía sostenible [13, 14]. El biodiesel producido de microalga se está investigando como una alternativa al uso convencional de cultivos vegetales para dicho fin, como las semillas [74, 144]. Las el cultivo de microalgas en comparación a estos cultivos tradicionales, produce más aceite, consume menos espacio (Ver tabla 1-7) y pueden ser crecidas en condiciones de terreno no apto para la agricultura [75, 144]. Por ende, aspectos técnicos y ambientales como fertilizantes y uso de la tierra resultan ser innecesarios para la producción de biomasa a larga escala [24].

La transesterificación es la reacción de un acido graso o aceite con un alcohol para formar esteres y glicerol. El aceite de alga es convertido en biodiesel en una reacción de éste tipo [1]. El aceite extraído de la microalga es mezclado con alcohol y un ácido o una base para producir metilésteres de acido graso que constituyen el biodiesel [68].

Muchas microalgas tienen un contenido alto de aceite, el cual puede ser convertido a biodiesel [2]. El contenido de aceite de algunas microalgas excede el 80% en peso seco de biomasa algal [77, 145]. El uso de algas como cultivos energéticos tiene gran potencial debido a su gran adaptabilidad de crecimiento en ambientes cercanos al mar o con suficiente humedad salina en el ambiente, y debido a que las dos terceras partes de la superficie de la tierra son agua, hace de las microalgas una opción con gran proyección para cubrir las necesidades energéticas globales [39, 83, 85].

Extraído el aceite de la microalga, la pasta residual cobra un gran interés debido a su alto contenido de almidón, el cual en convertido por enzimas u otros procesos de sacarificación, a azucares [146]. El azúcar es convertido a etanol por microorganismos

como levaduras [147]. La producción de etanol usando microalgas como materia prima puede llevarse a cabo de acuerdo al procedimiento descrito a continuación. En primer lugar, el almidón de microalga es liberado de las células por la acción de un equipo de ruptura celular como los homogenizadores de alta presión, o por acción de enzimas. Cuando las células comienzan a degradarse, la levadura *Saccharomycess cerevisiae* es agregada a la biomasa para que comience la fermentación. El producto de la fermentación es Bioetanol [17, 148]. El etanol es bombeado y alimentado a un tren de destilación y usualmente a un equipo de tamices moleculares ara conseguir un grado de pureza analítico. El etanol producido se basa en la fotosíntesis microalgal y la fermentación anaeróbica intracelular [146].

1.6 Otras aplicaciones y productos obtenidos de las microalgas

Dependiendo de la especia de microalga varios componentes químicos de alto valor pueden ser extraídos tales como pigmentos, antioxidantes, β-caotenos, polisacáridos, triglicéridos, ácidos grasos, vitaminas y biomasa, los cuales son ampliamente usados como productos in diferentes sectores industriales (Farmacéuticos, nutraceuticos, alimentos funcionales, biocombustibles).

1.6.1 Aplicaciones ambientales de las microalgas

La producción de biodiesel y otros bioproductos de microalgas pueden ser más ambientalmente sostenibles, con respecto a costo-efectividad y rentabilidad (ver Tabla 1-7), si se combinan con procesos tales como aguas residuales y tratamientos de gases de combustión. De hecho varios estudios de producción de productos con valor fueron hechos en combinación con aplicaciones ambientales.

- **Gases de combustión como nutriente de microalgas:** dos principales métodos de mitigación de CO_2 son normalmente usados: el aprovechamiento basado en la reacción química y la mitigación biológica [86, 149, 150]. Por un lado, la mitigación basada en la reacción química consume energía, lo cual es un proceso

de alto costo, y tiene problemas ya que el dióxido de carbono capturado y los deshechos absorbidos necesitan ser eliminados [151, 152]. Por otro lado, la mitigación biológica ha atraído mucha atención en los últimos años lo que lleva a la producción de energía a partir de biomasa en los procesos de fijación de CO_2 a través de la fotosíntesis [110, 153]. Los gases de combustión de las plantas de poder son responsable de más del 7% del total de las emisiones de CO_2 de la energía usada. También los gases de escape contienen más de 15% de dióxido de carbono proporcionando una fuente energética rica en dióxido de carbono para el cultivo de microalgas potencialmente una ruta más eficiente para la fijación del dióxido de carbono [103, 154, 155]. Los estudios de laboratorio llevados a cabo para el alga verde *Monoruphidiumminutum*, demuestran que esta alga puede utilizar de manera eficiente los gases de combustión simulados que contienen altos niveles de dióxido de carbono, así como los óxidos de azufre y nitrógeno, como materia prima para producir biomasa [156, 157]. En este estudio existen varios parámetros importantes para la productividad como los niveles de nutrientes y el régimen de burbujeo. El alga verde *Chlorophyta* [158] mostró la capacidad de fijar CO_2, mientras que la captación de energía solar tuvo una eficiencia de 10-50 veces mayor que la de las plantas terrestres [81, 159, 160].

- **Nitrógeno y fósforo de aguas residuales como nutriente de microalgas:** los sistemas acuáticos envuelven la producción de microalgas y tratamiento de aguas residuales (aminoácidos, enzimas, o aguas residuales industriales) y parecen ser bastante prometedoras para el crecimiento de microalgas combinado con limpieza biológica [131, 161]. Esto permite la nutrición de las microalgas usando componentes orgánicos (nitrógeno y fosfatos) disponibles en algunas aguas residuales industriales que no contengan metales pesados y radioisótopos [50, 72]. Adicionalmente las microalgas pueden mitigar los efectos de efluentes de aguas residuales y fuentes industriales de deshechos de nitrógeno tales como los procedentes de los tratamientos de aguas o pescado de acuicultura y al mismo tiempo contribuyen en la biodiversidad. Aslan y Kapdan uso *C. Vulgaris* para remover nitrógeno y fosforo de aguas residuales con un porcentaje de eficiencia de remoción del 72% para nitrógeno y 28% para fosforo, otra especie de microalga utilizada para la remoción de nitrógeno es *Chlorella, Scenedesmus* y *Spirulina* [34, 47].

1.6.2 Aplicaciones de las microalgas en la salud humana

Tradicionalmente suplementos derivados de plantas han sido predominantes en el mercado. Sin embargo los beneficios a la salud de microorganismos acuáticos tales como algas eran empezando a ser investigados más reconocidos y apreciados, dentro de las últimas tres décadas, especialmente desde que se introdujo los suplementos probióticos [25, 162]. Las microalgas son vistas como un gran recurso para tener proteínas de gran valor y calidad que otras fuentes vegetales como trigo, arroz, y legumbres [163, 164]. Las microalgas han sido contiene varios tipos diferentes de esteroles, incluyendo clionasterol aislados de *Spirulina sp. Y S. platensis* Que ha sido mostrado para aumentar la producción de plaminogen activado para evitar o prevenir las enfermedades cardiovasculares [165].

Complejos polisacáridos de *Chlorella pyrenoidosa* y posiblemente *Chlorella ellipsoidea* contienen glucosa y cualquier combinación de galactosa, ramnosa, manosa, arabinosa, glucosamida N-acetil-galactosamina y N-acetil. Estos complejos se cree que tienen propiedades inmunomoduladoras, actividad estimulante inmune específica y puede inhibir la proliferación de *Listeria monocytogenes* y *Candida albicans*. Además, los extractos de *Chlorella* pueden ser administrados a mamíferos, aumentando la proliferación de esplenocitos y la producción de citoquinas, y puede ser utilizado como un suplemento para estimular aún más la respuesta inmune [163, 165].

Otras microalgas que son utilizadas para la salud humana son: Scenedesmus sp, Dunaliella sp, *N. oculata, Phaeodactylum tricornutum, Thalassiosira pseudonan, H. pluviali, P. tricornutum, Nannochloropsis sp* [162].

1.6.3 Aplicaciones de las microalgas en acuicultura y comida animal

La microalga también puede ser utilizada para cultivar zooplancton (rotíferos, cladóceros, copépodos o artemia) usado como alimento vivo en crustáceos y siembra de peces. *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica* se consideran el mejor alimento para los bivalvos larval. Drum-Scenedesmus frito se puede utilizar como alimento *Artemia* y *Chlorella* (marinas, de agua dulce o seco) es muy adecuado para el cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis*, pero no para las almejas o las ostras[163, 166, 167].

Dos distintas maneras de cultivos de microalgas son aplicadas en la acuicultura:

- Las poblaciones naturales de fitoplancton, ya sea que se encuentren en la naturaleza o de cultivos enriquecidos con la adición de nutrientes[168, 169].

- Los monocultivos de algas, por ejemplo cuando se requiere una fuente de alimentación de alta calidad con conocidas propiedades nutricionales o libre de bacterias, cultivos de algas con un menor riesgo de introducción de agentes patógenos no deseados en los cultivos de origen animal[162, 170].

1.7 Caracterización de las microalgas enfocadas a una biorefinería integral en este estudio: *Chlorella Vulgaris* y *Schizochytrium sp. N-2*

Los géneros de microalgas caracterizados para este trabajo de tesis, corresponde a un género versátil cuya composición de lípidos, carbohidratos, fibras, proteínas entre otros, los vuelve una fuente potencial para la producción masiva de metabolitos de alto valor agregado, desde biocombustibles, fertilizantes, comida animal, aceites finos, energía por citar unos cuantos [2, 27, 28, 171, 172].

1.7.1 Caracterización de la microalga *Chlorella Vulgaris*

El tipo de microalga Chlorella está siendo investigada debido a que una célula de esta especie contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos [113]. Según se ha documentado, posee beneficios terapéuticos, como la capacidad de desintoxicar al organismo de metales pesados como el Hg, el Cd y el Pb entre otros químicos, que son contaminantes agregados a insecticidas o plásticos. Además se piensa que posee la capacidad de prevenir el cáncer [10]. En la Tabla 1-8 se muestra la composición química total de la microalga Chlorella Vulgaris.

Por otro lado, en la Tabla 1-9 se muestran los componentes principales de la biomasa de Chlorella Vulgaris, tratada previamente con etanol, cuyo contenido proteico resultó superior al 40 y 30 % en términos de proteínas brutas y verdadera, respectivamente,

seguidas cuantitativamente por los carbohidratos. También se señala la presencia de cenizas, fibra cruda y ácidos nucléicos como elementos minoritarios (22.79 %), así como concentraciones de lípidos inferiores al 1 %[37].

Tabla 1-7: Contenido de lípidos y productividad para diferentes especies de microalgas [8, 173]

Especie de microalga	Contenido de lípidos (% peso de biomasa seca)	Productividad de lípidos ($\frac{mg}{L\ dia}$)	Productividad volumétrica de biomasa ($\frac{g}{L\ dia}$)	Área de productividad de biomasa ($\frac{g}{m^2\ dia}$)
Ankistrodesmus sp.	24.0–31.0	-	-	11.5–17.4
Botryococcus braunii	25.0–75.0	-	0.02	3.0
Chaetoceros muelleri	33.6	21.8	0.07	-
Chaetoceros calcitrans	14.6–16.4/39.8	17.6	0.04	-
Chlorella emersonii	25.0–63.0	10.3–50.0	0.036–0.041	0.91–0.97
Chlorella protothecoides	14.6–57.8	1214	2.00–7.70	-
Chlorella sorokiniana	19.0–22.0	44.7	0.23–1.47	-
Chlorella vulgaris	5.0–58.0	11.2–40.0	0.02–0.20	0.57–0.95
Chlorella sp.	10.0–48.0	42.1	0.02–2.5	1.61–16.47/25
Chlorella pyrenoidosa	2.0	-	2.90–3.64	72.5/130
Chlorella	18.0–57.0	18.7	-	3.50–13.90
Chlorococcum sp.	19.3	53.7	0.28	-
Crypthecodinium cohnii	20.0–51.1	-	10	-
Dunaliella salina	6.0–25.0	116.0	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
Dunaliella primolecta	23.1	-	0.09	14
Dunaliella tertiolecta	16.7–71.0	-	0.12	-
Dunaliella sp.	17.5–67.0	33.5	-	-
Ellipsoidion sp.	27.4	47.3	0.17	-
Euglena gracilis	14.0–20.0	-	7.70	-
Haematococcus pluvialis	25.0	-	0.05–0.06	10.2–36.4
Isochrysis galbana	7.0–40.0	-	0.32–1.60	-
Isochrysis sp.	7.1–33	37.8	0.08–0.17	-
Monodus subterraneus	16.0	30.4	0.19	-
Monallanthus salina	20.0–22.0	-	0.08	12
Nannochloris sp.	20.0–56.0	60.9–76.5	0.17–0.51	-
Nannochloropsis oculata.	22.7–29.7	84.0–142.0	0.37–0.48	-
Nannochloropsis sp.	12.0–53.0	37.6–90.0	0.17–1.43	1.9–5.3
Neochloris oleoabundans	29.0–65.0	90.0–134.0	-	-
Nitzschia sp.	16.0–47.0	-	-	8.8–21.6
Oocystis pusilla	10.5	-	-	40.6–45.8
Pavlova salina	30.9	49.4	0.16	-
Pavlova lutheri	35.5	40.2	0.14	-
Phaeodactylum tricornutum	18.0–57.0	44.8	0.003–1.9	2.4–21
Porphyridium cruentum	9.0–18.8/60.7	34.8	0.36–1.50	25
Scenedesmus obliquus	11.0–55.0	-	0.004–0.74	-
Scenedesmus quadricauda	1.9–18.4	35.1	0.19	-
Scenedesmus sp.	19.6–21.1	40.8–53.9	0.03–0.26	2.43–13.52
Skeletonema sp.	13.3–31.8	27.3	0.09	-
Skeletonema costatum	13.5–51.3	17.4	0.08	-
Spirulina platensis	4.0–16.6	-	0.06–4.3	1.5–14.5/24–51
Spirulina maxima	4.0–9.0	-	0.21–0.25	25
Thalassiosira pseudonana	20.6	17.4	0.08	-
Tetraselmis suecica	8.5–23.0	27.0–36.4	0.12–0.32	19
Tetraselmis sp.	12.6–14.7	43.4	0.30	-

Tabla 1-8: Composición química total de la microalga Chlorella Vulgaris (% en base seca) [8]

Componente	Valor
Proteínas	51 – 58
Carbohidratos	12 – 17
Lípidos	14 – 22
Ácidos nucleídos	4 - 5

Tabla 1-9: Análisis Bromatológico de la biomasa de Chlorella [8, 10].

Componentes	Porcentaje
Perdidas por desecación	7.18
Nitrógeno total	7.13
Proteína Total	44.56
Carbohidratos	16
Fibra cruda	8.20
Lípidos	0.29
Cenizas	8.90
Ácidos nucléicos totales	5.69

Con el fin de realizar una caracterización más aproximada del alga estudiada, a continuación se presentan la composición aminoácido y de ácidos grasos correspondientes a *Chlorella Vulgaris*. Por lo tanto, como se observa en las Tabla 1-10, el nivel aminoacídico de la Chlorella vulgaris al compararse con el patrón de referencia de WHO/FAO/UNU (1985) para preescolares, indica que su proteína tiene como primer limitante a los aminoácidos sulfurados (AAS) con 94,0%, es decir, la proteína de Chlorella vulgaris tiene un déficit de AAS del 6,0% que, como se aprecia, no es muy crítico. Sin embargo, comparados con el patrón de referencia de WHO/FAO/UNU (1985) para adultos no presenta ningún limitante, lo que la convierte en una proteína de alta calidad.

Por otra parte, en la Tabla 1-11 se muestra la composición de ácidos grasos presentes en Chlorella vulgaris, después de siete días de cultivo en un medio de control .Los ácidos grasos 16:0, 18:0, 18:1 y 18:3 n-6 fueron los encontrados en mayores concentraciones.[113]

Tabla 1-10: Contenido de aminoácidos de *Chlorella vulgaris*, comparando con el patrón WHO/FAO/ONU (1985)

Aminoácidos esenciales (g / 100 g proteína)	Chlorella vulgaris	Patrón WHO/FAO/UNU (1985)	
		Preescolares	Adultos
Isoleucina	4.82	2.8	1.3
Leucina	10.78	6.6	1.9
Lisina	7.70	5.8	1.6
Total aminoácidos sulfurados	2.35	2.5	1.7
Total aminoácidos aromáticos	9.04	7.4	2.4
Treonina	5.60	3.4	0.9
Triptófano	1.12	1.1	0.5
Valina	n.r	3.5	1.3

n.r= no reportado

1.7.2 Caracterización de la microalga *Schizochytrium sp. N-2*

La microalga *Schizochytrium sp. N-2* es una clase de microalga que pertenece al reino *Chromista* y que se encuentra generalmente en ecosistemas marinos. Se caracteriza por ser saprotrófica y por ser una fuente de consumo en la dieta animal y humana. Su potencial es derivado a su alto contenido de ácidos grasos especialmente, ácidos omega 3 y 6, principalmente Acido Docosahexaenoico (DHA) [174, 175]. Numerosos estudios han puesto de manifiesto los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 tanto en individuos sanos como en aquellos con enfermedades crónicas sobre la regulación de los niveles lipídicos, y determinadas funciones cardiovasculares e inmunológicas. Dentro de los ácidos omega-3, el DHA es un componente importante de los fosfolípidos de las membranas celulares, especialmente en el cerebro y en la retina, siendo indispensable para su correcto funcionamiento y desarrollo [133, 176]. En la Tabla 1-12 se observa su caracterización con respecto a sus ácidos grasos.

Tabla 1-11: Composición (%) de los ácidos grasos de la fracción lipídica extraída de *Corella Vulgaris* después de siete días de cultivo en el medio de control [10, 113, 124].

Ácidos grasos	**Acrónimo**	**Valor [%]**
Acido mirístico	14:0	ND
Acido mirístico	14:1	ND
Acido palmítico	16:0	19.20
Acido palmitoleico	16:1	0.87
Acido margárico	17:0	4.19
Acido margárico	17:1	1.25
Acido esteárico	18:0	14.60
Acido oleico	18:1	12.66
Acido linoléico	18:2	2.77
Acido linolénico	18:3n-6	21.09
Acido linolénico	18:3n-3	ND
Acido araquidico	20:0	0.36
Acido eicosenoico	20:1	4.09
Acido eicosenoico	20:2	3.91
Acido eicosatrienoico	20:3	3.30
Acido eicosapentaenoico	20:5	2.10
Acido erúcico	22:1	0.05
Acido lignocerico	24:0	ND
Acido docosahexaenoico (DHA)	22:6	ND
Total saturados	Total saturados	38.35
Total insaturados	Total insaturados	53.09
Total monoinsaturados	Total monoinsaturados	18.92
Total poli-insaturados	Total poli-insaturados	34.17

Tabla 1-12: Caracterización de los ácidos grasos de alga *Schizochytrium* sp. N-2.[26]

Acido Graso	Peso Molecular	Fracción Masica	Fracción Molar
15:0	242	0.287	0.335
16:0	256	0.213	0.235
18:1	282	0.049	0.049
18:3	278	0.002	0.002
20:4	304	0.003	0.003
20:5	302	0.009	0.008
22:4	332	0.067	0.057
22:6	328	0.361	0.311

15:0, Acido Pentadecaciclico; 16:0, Acido Palmitico; 18:0, Acido Estearico; 18:1,Acido Oleico; 18:2, Acido Linoleico; 18:3, Acido α-Linoleico; 20:4, Acido Arachidonico; 20:5, Acido Ecosapentanoico (EPA); 22:4, Acido Docosatetranoico; 22:6, Acido Docosahexanoico (DHA).

.

2. Capítulo 2: Metodología

El desarrollo de este trabajo involucra dos estrategias de ejecución: modelación-simulación y experimentación. El primero como se describirá a continuación muestra las estrategias basadas en software comerciales y modificaciones para resolver problemas de optimización, solución de balances de materia y energía, análisis de sensibilidad, estimación económica y ambiental. El segundo describe los materiales y métodos que se llevaron a cabo para evaluar el crecimiento de las microalgas y su desempeño en sistemas de crecimiento autotróficos y heterotróficos.

La modelación y simulación de procesos se derivó del análisis bibliográfico que visualizó un panorama prometedor para la producción de biocombustibles en torno a una biorefinería sostenible a partir de las microalgas ***Corella Vulgaris*** y ***Schizochytrium sp*. N-2.** Experimentalmente se evaluó el crecimiento de las microalgas ***Chlorella Vulgaris*** y ***Chlorella protothecoides*** que fueron adquiridas en The Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas en Estados Unidos, con el fin de utilizar microorganismos de base comercial y sin problemas de introducción al ecosistema colombiano.

2.1 Modelación-simulación de procesos

En este nivel se describirá de forma general las metodologías empleadas para realizar la evaluación técnica, económica y ambiental de cada uno de los escenarios de proceso de interés. Se muestra de manera global como se resolvieron los balances de materia y energía, los costos de producción de cada uno de los metabolitos de importancia industrial y el cálculo del impacto ambiental del proceso sobre el ecosistema.

2.1.1 Evaluación técnica

La modelación y simulación de los procesos a partir de las microalgas ***Corella Vulgaris*** y ***Schizochytrium sp*. N-2** se llevó a cabo teniendo en cuenta diversos escenarios nombrados a continuación:

- **Obtención de sustrato y nutrientes para las microalgas**: Se simuló la obtención del sustrato a partir de una corriente de gases de combustión y

nutrientes de las aguas residuales de un proceso de generación de energía a partir de la gasificación y posterior combustión directa de la cascarilla de arroz.

- **Cultivo de microalgas:** Se simuló la purificación de CO_2 como sustrato de microalgas. Su crecimiento fue simulado en un fotoreactor, la recuperación de biomasa, el secado y la extracción de metabolitos por los métodos de ruptura celular y extracción con solventes.

- **Diseño del fotoreactor:** Se propuso, se modeló, se simuló y se optimizó un fotoreactor enchaquetado con incidencia de luz externa y distribución de CO_2 por burbujeo para el crecimiento de biomasa de microalgas conforme las características del equipo adquirido por el Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales para tal fin.

- **Producción de Biodiesel de microalga:** A partir del aceite de microalga ***Chorella Vulgaris***, se simuló el esquema tecnológico convencional de producción de biodiesel vía catálisis básica y cogeneración de la pasta.

- **Producción de Bioetanol de microalga:** A partir de la pasta de microalga ***Chorella Vulgaris***, se simularon dos esquemas de producción de etanol carburante empleando destilación extractiva y tamices moleculares para su purificación.

- **Producción de Aceites de Omega 3 y 6:** A partir del caldo de biomasa de ***Schizochytrium sp*. N-2** se simuló una biorefinería de producción de aceites omega 3 y 6. Se comparó la influencia del método de extracción de metabolitos, por ruptura celular y extracción con solventes.

- **Generación de energía eléctrica a partir de microalgas:** se simuló la gasificación y la combustión directa de la pasta y los aceites respectivamente, de la microalga ***Schizochytrium sp*. N-2.**

La simulación de cada uno de los escenarios propuestos se realizó en software comercial ASPEN PLUS V7.2 que es un simulador estacionario, secuencial modular, orientado a la industria de procesos química y petroquímica, el cual modela y simula cualquier tipo de proceso para el cual hay un flujo continuo de materiales y energía de una unidad de proceso a otra.

El paquete de simulación se puede dividir en tres bloques fundamentales:

a. **Eje de simulación:** Es el núcleo del programa, escrito en Fortran es el que soporta todo el modelo desde la lectura del archivo de entrada que describe el proceso hasta su resolución por algoritmos numéricos. Tiene diferentes módulos aparte del de simulación: optimización, estimación, regresión, entre otros.

b. **Interfase gráfica de usuario*:*** Es el entorno gráfico de modelado. En la interface gráfica de usuario se crean los diagramas de flujo de proceso. Esta interfase posee un sistema experto que va guiando en la construcción del modelo. Tiene incorporado una ayuda con hiperlinks, de forma que se accede de forma rápida a los diferentes menús de iconos que se identifican con los modelos de su librería. Brinda además, un modo de dibujo en el cual se puede aumentar la calidad de la descripción del modelo.

c. **Propiedades físicas*:*** Bancos de datos con modelos termodinámicos y propiedades de un gran un número de componentes: orgánicos, inorgánicos, electrolitos y sólidos. Las propiedades más empleadas durante las simulaciones son: Coeficientes de fugacidad, Entalpías, Densidades, Entropías, Energías libres. Además, su flexibilidad permite seleccionar directamente los métodos que se quiere emplear como: NRTL, Wilson, Redlich-Kwong, UNIFAC, UNIQUAC entre otros dependiendo de un análisis de las sustancias que integran la simulación del proceso y la rigurosidad que se desee, de tal forma se deben seleccionar según el tipo de componentes y condiciones de operación de trabajo así: Mezclas ideales, Hidrocarburos y gases de hidrocarburos, Mezclas no polares, Mezclas altamente no ideales, Asociación y dimerización en fase vapor, Mezclas polares, Aminas, Petróleo.

d. **Librería de Modelos:** Aspen Plus divide los modelos en las siguientes categorías:

- Alimentaciones y productos
- Mezcladores y Separadores
- Flashes y Cambiadores
- Destilación Shortcut
- Separaciones rigurosas(destilación, extracción, absorción)
- Reactores
- Bombas y compresores
- Tuberías
- Sólidos
- Cristalización

e. **Algoritmos de resolución:** se cuenta con diferentes tipos de algoritmos de solución:

- *Simulación*: Broyden, Wegstein, Newton, Secante, directo
- *Optimización*: SQP (Programación cuadrática)
- *Regresión*: Britt-Luecke, Deming (WLS)

La simulación de los escenarios propuestos se realizó siguiendo un orden lógico, así:

a. Definición de la topología de proceso: definiendo las unidades de operación del proceso; definiendo las corrientes de proceso que fluyen entre las diferentes unidades; seleccionando modelos de unidades de operación de la librería de Aspen.

b. Ingreso de las compuestos involucrados en el proceso.

c. Elección de los modelos termodinámicos del banco de Aspen para representar las propiedades físicas.

d. Especificación de los caudales de flujo y las condiciones termodinámicas de las corrientes de alimentación al proceso.

e. Especificación de las condiciones de operación para las unidades del diagrama de flujo de proceso.

f. Imposición de las condiciones de diseño: variar una expresión (variable o relación entre ellas) para alcanzar una especificación.

g. Análisis de sensibilidad.

h. Interfases de usuario con Excel.

Cabe anotar que debido a que los escenarios contemplados manejan en sus corrientes de proceso, sustancias de origen biológico, células y materiales no convencionales que la base de datos de Aspen Plus no incorpora, se ingreso dichos compuestos al software y se calculó las propiedades por métodos de predicción como el propuesto por Marrero y Gani(2001) [177] y la base de datos National Institute of Standars and Technology (NIST).

Por otro lado, se utilizó el software comercial MATLAB R2008B para la simulación y modelación del fotoreactor implementando rutinas y algoritmos de solución de sistemas de ecuaciones diferenciales y algebraicas acopladas (Sistemas conocidos como DAE). Se hizo un desarrollo matemático del modelo que describe el comportamiento de las microalgas dentro del fotoreactor tomando como referencia artículos de revista internacional especializados en este tema.

MATLAB es un paquete software orientado al cálculo numérico, matrices, procesamiento y análisis de señales y gráficas el cual incorpora unas librerías de funciones o "**Toolboxes"** asociadas a las diferentes aplicaciones, para el caso del desarrollo de ésta tesis, se emplearon:

- ODE23s: función de la librería que permite solucionar sistemas de ecuaciones diferenciales de primer orden en sistemas rígidos de forma cualitativa y cuantitativa.
- fsolve: función de la librería que permite ensamblar funciones con sistemas de ecuaciones algebraicos y optimizar de acuerdo a algoritmos implementados la búsqueda de soluciones en una región de confianza.
- pchip: función de la librería que permite organizar técnicas de interpolación de datos y algoritmos de Homotopía con rutinas de colocación ortogonal.

2.1.2 Evaluación Económica

La evaluación económica de los escenarios evaluados se llevo a cabo en el paquete de simulación de Aspen Technology, Inc., USA.: ASPEN PROCESS ECONOMIC ANALYZER el cual puede trabajar con los reportes generados al resolver los balances de materia y energía en Aspen Plus.

Aspen process economic analyzer puede hacer el dimensionamiento básico de los equipos, para luego, con los parámetros de inversión especificados por el usuario (impuestos, capital de trabajo, vida económica del proyecto, etc), estimar el capital de inversión, los costos de operación y las ganancias. Con los resultados obtenidos, se generan los flujos de caja correspondientes y se procede al análisis de rentabilidad. Además, el usuario puede generar reportes de los costos involucrados en proyecto y los detalles del diseño.

La aproximación detallada al análisis económico del proceso empleada por este paquete de simulación se puede observar en la figura 2-1.

En este trabajo, el análisis económico se realizó usando la información del diseño de los escenarios suministrada por Aspen Plus como se dijo anteriormente bajo las condiciones de la economía Colombiana (tasa de interés anual del 17% y tasa interna de retorno del 33%). Se empleó el método de depreciación de la línea recta considerando un periodo de análisis de 12 años. Cuando fue necesario, los precios de las materias primas fueron tomados de los reportes internacionales de ICIS pricing. Los cargos operativos como los costos de labor de supervisor y operarios en el contexto colombiano se tomaron como

USD 4.29/h y USD 2.14/h respectivamente. Los costos de la electricidad, agua potable, vapor de baja y alta presión fueron de USD 0.0304/kWh, USD 1.25/m^3 y USD 8.18/ton respectivamente.

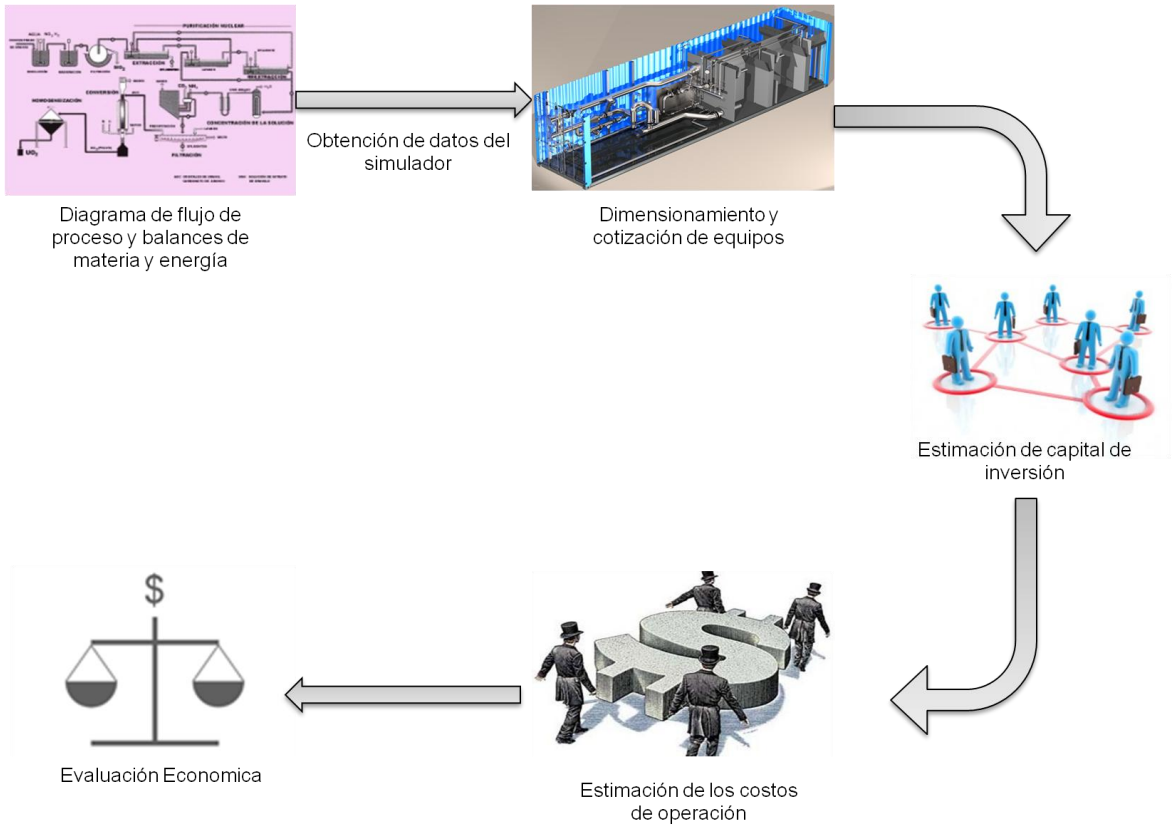

Figura 2-1: Pasos ejecutados por Aspen process economic analyzer para la evaluación de procesos.

2.1.3 Evaluación Ambiental

La metodología del algoritmo WAR, desarrollada por el National Risk Management Research Laboratory de la U.S. Environmental Protection Agency, propone añadir una relación de conservación sobre el potencial de impacto ambiental basado en los flujos de impacto de entrada y salida del proceso. Para su aplicación la EPA desarrolló un software llamado WAR GUI.

El potencial de impacto ambiental de una cantidad dada de materia o energía puede ser definida como el efecto que esta materia y energía tendría en promedio sobre el ambiente si ellos fueran descargados fuera del proceso. Dado que la definición implica

que el impacto es una cantidad aún no realizada, el potencial de impacto ambiental es de naturaleza probabilística. Así, los potenciales de impacto ambiental de una industria química son generalmente causados por la energía y la materia que el proceso adquiere o emite al ambiente.

El potencial de impacto ambiental es una cantidad que no puede ser medida directamente, sin embargo, se puede calcular a partir de cantidades medibles usando relaciones funcionales entre ellas.

El software WAR GUI que incorpora el algoritmo de reducción de residuos en el diseño de procesos, permite al usuario analizar mediante valores de potencial de impacto ambiental y gráficas el efecto que el proceso tendría sobre el ambiente, con base en 8 categorías de impacto divididas en cuatro categorías de impacto atmosférico global: potencial de calentamiento global (GWP), potencial de agotamiento de ozono (ODP), potencial de acidificación o lluvia ácida (AP) y oxidación fotoquímica o potencial de formación de smog (PCOP)., y cuatro categorías de impacto toxicológico global: potencial de toxicidad humana por ingestión (HTPI), potencial de toxicidad humana por inhalación o exposición dérmica (HTPE), potencial de toxicidad acuática (ATP), y potencial de toxicidad terrestre (TTP) (Ver Figura 2-2).

- **El potencial de toxicidad humana por ingestión (HTPI)** es aproximado por el valor de la dosis letal a través de ingestión que mataría el 50% de una muestra de ratas. Este es un indicador popular para evaluar la toxicidad de los químicos. Los LD50s son generalmente reportados en unidades de mg de químico/Kg rata. En este sistema, un valor mayor de LD50 representa un químicomenos tóxico, por lo tanto, este valor de impacto es obtenido invirtiendo el valor del LD_{50}:

$$HTPI = \frac{1}{LD_{50}} \quad \textbf{(2.1)}$$

- **El potencial de toxicidad humana por inhalación o exposición dérmica (HTPE)** es aproximado usando los valores límite umbral de 8 horas (TLV) como es recomendado por OSHA (Occupational Safety and Health Administration), ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists o NIOSH (National Institute for Occupational Safetyand health). Esta fue considerada ser

una medida adecuada en comparación con los químicos que amenazarían la salud humana a través de rutas de inhalación o exposición dérmica. Las unidades para la LTV están en mg/m^3:

$$HTPE = \frac{1}{TLV} \quad \textbf{(2.2)}$$

- El potencial de toxicidad acuática (ATP) es estimado usando datos toxicológicos para una especie representativa de pez, Pimephales promelas (peces pequeños). Esta especie fue escogida debido a su aceptación como un indicador universal y a la prevalencia de datos. Los datos vienen en la forma de LC50, una concentración letal que causa la muerte en el 50% de los especímenes de prueba. El valor en puntos para esta categoría es calculado como el inverso de la LC_{50}:

$$ATP = \frac{1}{LC_{50}} \quad \textbf{(2.3)}$$

- **El potencial de toxicidad terrestre (TTP**) es determinada usando datos toxicológicos de una especie terrestre, la rata. Esta especie fue escogida debido a su aceptación como un indicativo de las especies terrestres y a la prevalencia de datos. El valor es el mismo usado para estimar el potencial de toxicidad humana por ingestión.

- **El potencial de calentamiento global (GWP)** es determinado comparando la cantidad de radiación infrarroja que una unidad de masa de químico puede absorber en 100 años a la que puede absorber una unidad de masa de dióxido de carbono en el mismo espacio de tiempo. Esta medida toma en cuenta el decaimiento de los químicos en la atmósfera en este intervalo de tiempo.

- **El potencial de agotamiento de ozono (ODP)** es determinado comparando la velocidad a la cual una unidad de masa de químico reacciona con ozono para formar oxigeno molecular a la velocidad a la cual una unidad de masa de CFC-11(triclorofluorometano) reacciona con ozono para formar oxigeno molecular. En general, para un químico tener ODP debe contener un átomo de bromo o cloro.

Estas cantidades toman en cuenta la descomposición de los químicos en la atmósfera. Los productos de descomposición no son incluidos como fuente de ODP.

- **El potencial de lluvia ácida o potencial de acidificación (AP)** es determinado comparando la velocidad de liberación de H+ promovida por un químico a la velocidad de liberación de H+ en la atmósfera promovida por el SO2.

- **El potencial de oxidación fotoquímica (PCOP)** o potencial de formación de smog (SFP) es determinado comparando la velocidad a la cual una unidad de masa de químico reacciona con un radical hidroxilo (OH) a la velocidad a la cual una unidad de masa de etileno reacciona con (OH).

El algoritmo de reducción de residuos incorpora una interfase con el software Aspen Plus, mediante la cual, se genera un reporte de los balances de materia y energía del proceso y se importa dicha información a WAR GUI para su evaluación ambiental que se fundamenta en la conservación de potencial de impacto ambiental **(PEI)** alrededor de un volumen de control o sistema (escenario de proceso). (Ver Figura 2-3)

El potencial de impacto total (PEI total) se determino por la suma de todas las categorías de potencial de impacto ambiental individuales así:

$$\boldsymbol{PEI_{Total}} = \sum_{i}^{n} \propto_{i} \boldsymbol{\gamma_{i}} \qquad \textbf{(2.4)}$$

Donde $\boldsymbol{\alpha_i}$ representa el factor de peso de la categoría de impacto i que para los escenarios evaluados es el mismo valor e igual a 1, y $\boldsymbol{\gamma_i}$ es el potencial de impacto de para la categoría i.

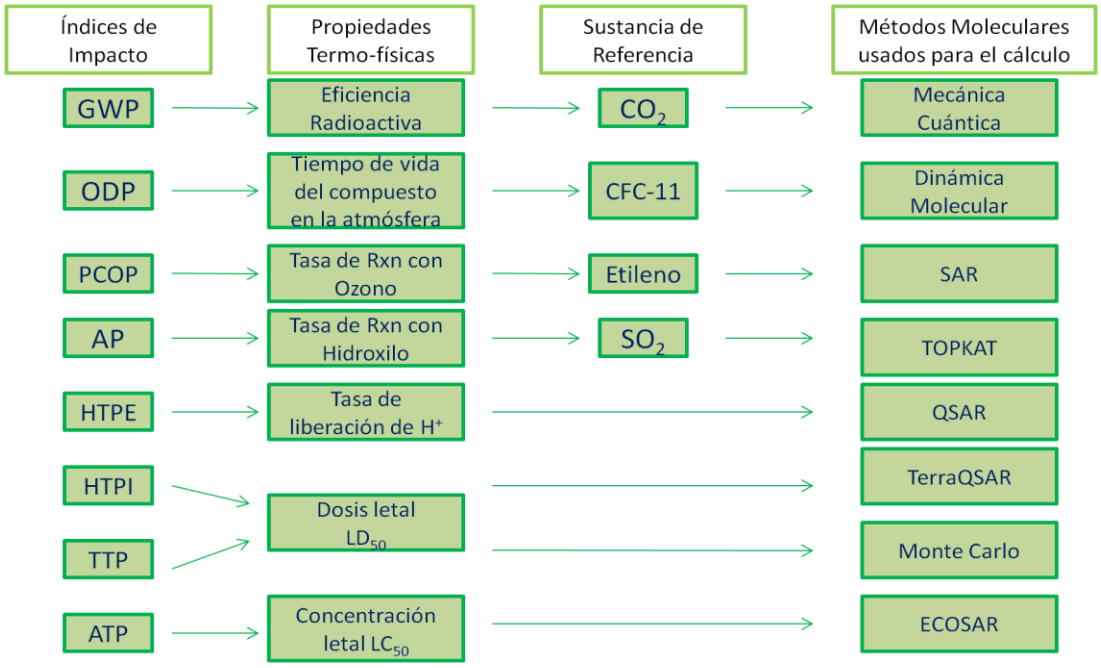

Figura 2-2. Categorías de impacto ambiental consideradas en este estudio a partir del software WAR GUI

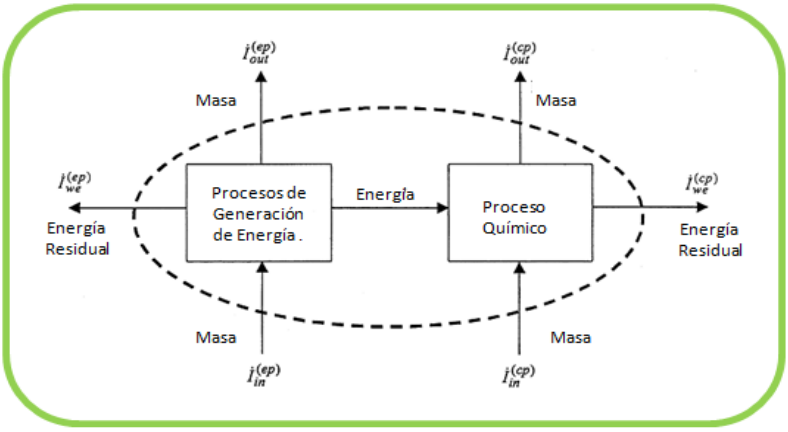

Figura 2-3. Balance de materia y energía e impacto ambiental de un proceso químico.

2.2 Evaluación experimental del crecimiento de biomasa de microalgas *Chlorella Vulgaris* y *Chlorella protothecoides*

Para evaluar el crecimiento de las microalgas *Chlorella Vulgaris y Chlorella protothecoides* se identificó y formuló un medio de crecimiento adecuado a los requerimientos de nutrientes y minerales necesarios para su cultivo basados en la literatura. En ambos casos se utilizó como referencia el medio sugerido por The Culture of Algae de la Universidad de Texas en Estados Unidos, donde se adquirieron las cepas. Los métodos y etapas de crecimiento, recolección y extracción de metabolitos de biomasa se describen a continuación.

- **Medio de cultivo:** en la Tabla 2-1 se puede observar los componentes y las cantidades estandarizadas del medio de cultivo propuesto para el crecimiento de las microalgas analizadas. En éste, se procuró dar unas fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno suficientes para lograr una adaptación buena de las cepas a un ambiente controlado basado en las publicaciones internacionales para el crecimiento de microalgas [34, 46, 50, 72]. La fuente de carbono seleccionada para adaptar la cepa fue la glucosa grado analítico. Sin embargo, cuando se escala a un medio autotrófico, dicha fuente de carbono es cambiada por dióxido de carbono.

Tabla 2-1. Medio de cultivo usado para el crecimiento de las microalgas *Chlorella Vulgaris y Chlorella protothecoides*

Medios de cultivo	**Volumen: 2,3 L**
Compuesto	**Cantidad (g)**
$(NH_4)_2SO_4$	0,575
CaCl2	0,0575
MgSO4	0,1725
KH2PO4	0,4025
NaCL	0,0575
proteasa peptona	2,3
Glucosa	34,5

- **Esterilización:** todos los materiales manipulados para el cultivo de las microalgas se autoclavaron a 121°C durante un periodo de 2 horas.

- **Cultivo heterotrófico:** Se cultivó las microalgas empezando con un volumen de 100 mL para su adaptación en una incubadora a una temperatura de 33°C con agitación permanente en completa oscuridad. Se escaló a un volumen de 600 mL en una unidad Biotron equipada con agitador de aspas, sensor de pH, temperatura y O_2 disuelto. Se realizó monitoreo de biomasa mediante conteo en cámara de Neubauer cada 24 horas durante 8 días utilizando azul de metileno para la identificación de microalgas vivas y muertas. Se sometió al cultivo a ciclos de luz ambiente en el día, y oscuridad completa en la noche.

- **Cultivo Autotrófico:** de manera análoga al cultivo heterotrófico, se escaló de un volumen de 100 mL de caldo de microalga, a un volumen de 500 mL del mismo medio y a condiciones de oscuridad total para luego escalar a un fotoreactor adquirido por el Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales y modificado por el grupo de Investigación de Procesos Químicos Catalíticos y Biotecnológicos para este estudio. En esta unidad, se escaló a un volumen de 2 litros y se cambió de fuente de carbono, reemplazando la glucosa por CO_2 y de régimen de oscuridad a luz incidente por una cinta de Led's 3M de 5m. Se monitoreó la biomasa de microalga cada 24 horas durante 5 días y se realizó conteo de células viables en cámara de Neubauer.

- **Recolección de Biomasa:** al final de cada ensayo, se dejó sedimentar por gravedad la biomasa de microalgas durante 2 días, el caldo de cultivo fue recolectado en frascos de Laboratorio boca angosta GL45 Duran de 1000 mL. Al cabo de éste tiempo, se bombeó el liquido claro de cultivo y se filtró al vacio la biomasa.

- **Secado:** La biomasa recolectada en papeles filtro se seco en una placa calefactora a 50°C durante 30 a 60 s para no dañar el material y las propiedades

de la biomasa y se cuantificó para obtener el rendimiento de biomasa total por caldo de cultivo.

- **Extracción de aceites:** La biomasa de microalga seca, se sometió a un proceso de extracción tipo Soxhlet durante 2 días en una solución de acetona-etanol en una relación de 0.11 volumen a volumen. Al final se cuantificó la pasta de biomasa residual y por un balance de materia simple la posible cantidad de aceite extraído.

3. Capítulo 3: Resultados y Discusión

Éste capítulo comprende dos grandes partes: los resultados obtenidos a partir de la modelación-simulación de los escenarios contemplados en la metodología y los resultados obtenidos del crecimiento experimental de la biomasa de microalgas.

3.1 Modelación-simulación de escenarios de procesos

En esta sección se demostrará la viabilidad técnica, económica y ambiental de una biorefinería de microalgas ***Schizochytrium sp*. N-2** demostrando la influencia del método de extracción de metabolitos sobre su desempeño. A su vez, se contempló el potencial de la biomasa de microalga para generar energía vía termoquímica, analizando los escenarios de gasificación de la pasta y combustión directa de los aceites.

En una segunda instancia se analizaron las etapas de obtención de sustratos y nutrientes, purificación, cultivo, producción de biodiesel, producción de Bioetanol y cogeneración a partir de la microalga ***Chlorella Vulgaris***. En conjunto, cada etapa interconectada se evaluó tecnológica, energética y ambientalmente en torno al concepto de Biorefinería.

3.1.1 Comparación Técnica de Métodos Extractivos en una Biorefinería basada en la microalga *Schizochytrium* sp. N-2

En este escenario se realizó el modelado, simulación y evaluación, del esquema tecnológico de una biorefinería de microalga Schizochytrium sp. N-2 para dos esquemas de extracción (solventes y ruptura celular) y tres productos (omega 3, biodiesel y gas de síntesis) utilizando el software comercial ASPEN PLUS 2006.5 y el algoritmo WAR para su avalúo ambiental. Se obtuvo rendimientos a omega 3 y biodiesel de 0.17-0.24 y 0.49-0.70 Kg de producto/Kg de microalga seca respectivamente. La demanda energética del proceso en kWh/Kg de microalga seca resulto en 35 kWh/Kg para el arreglo de ruptura celular y 106.3 kWh/Kg para el arreglo de extracción con solventes. En la generación de emisiones de proceso, el PEI por Kg de producto obtenido fue -14.53 y -4.79 para la extracción con solventes y para la ruptura celular, comparativamente. Se comprobó la influencia de los métodos de recuperación y extracción de aceites de microalga sobre la biorefinería, tanto energética como ambientalmente en una relación costo beneficio.

La simulación se realizó usando el software comercial ASPEN PLUS 2006.5 tomando como base de cálculo 1 ton/h de caldo de cultivo de biomasa crecida de microalga *Schizochytrium* sp. N-2 con una concentración de 3.8 Kg/m^3. El modelo utilizado fue NRTL-HOC debido a la presencia de ácidos orgánicos en el proceso. Las propiedades de las sustancias involucradas en la simulación se calcularon mediante el modelo para predicción de propiedades de moléculas complejas de Marrero-Gani, la base de datos NIST y el modelo UNIFAC-DMD, validadas con datos experimentales. La simulación se realizo sin ninguna consideración aproximada, contemplando un diseño de proceso riguroso y ajustado a lo reportado en la literatura. Los diagramas de flujo de proceso para la extracción por ruptura celular mediante Homogenización de alta presión y por extracción con solventes (hexano), así como la propuesta de biorefinería se muestran en la Figura 3-1.La evaluación ambiental se realizó empleando el software WAR GUI que incorpora el algoritmo de reducción de residuos en el diseño de procesos, permitiendo al usuario analizar mediante valores de potencial de impacto ambiental y gráficas el efecto que el proceso tendría sobre el ambiente, con base en 8 categorías de impacto: Potencial fotoquímico de creación de ozono (o smog) (POCP), Potencial de Acidificación (AP), Potencial de Agotamiento de la capa de ozono (ODP), Potencial de calentamiento Global (GWP), Potencial de Toxicidad Acuática (ATP), Potencial de Toxicidad Humana por

exposición (HTPE), Potencial de Toxicidad Humana por ingestión (HTPI), Potencial de Toxicidad terrestre (TTP).

Resultados: Se partió de procesar 1003.8 Kg h^{-1} de caldo de cultivo de alga con una concentración de 3.8 Kg m^{-3} en promedio. La tecnología elegida para la recuperación de la biomasa del bulk fue la centrifugación, debido a que es rápida y maneja grandes volúmenes de proceso. La centrifuga trabajo a una tasa de 300 rpm obteniéndose una pasta de Microalga con 90% en peso de contenido de agua en la corriente de sólidos y un consumo energético de 8 KW h^{-1} por 1.002 m^3 de suspensión. La pasta de biomasa fue luego sometida a un proceso de secado a 60ºC para no dañar las células ni las propiedades de estas, reduciendo el contenido de humedad de la biomasa de alga hasta 50% en peso, la cual como se dijo anteriormente, es lo recomendable para la extracción del aceite crudo. La energía requerida para el secado fue de alrededor de 22 KW por Kg de caldo de microalga procesado para lograr una pasta de alga deseada. La corriente de vapor de agua resultante del secado, como se observa en la Figura 3-1, se puede utilizar como alternativa de alimentación en la gasificación de la biomasa debido a su gran cantidad. La pasta de alga con un contenido en peso de 49.81% pasó a un homogenizador de alta presión en el cual, se realizó la ruptura de las células logrando extraer el 70% en peso del alga como aceite crudo en base seca (Ver Figura 3-1(a)). El equipo se especificó con una presión de descarga en la bomba de 600 bares. Para lograr una mayor eficiencia, la suspensión resultante pasó a un molino de bolas para incrementar la lisis celular y obtener así un mayor contenido de ácidos grasos poli-insaturados. El consumo de energía para lograr la ruptura celular fue de alrededor de 0.28 KW por Kg de caldo de microalga procesado. Otra alternativa manejada fue la extracción con solvente (Hexano), donde se logra extraer el 90% en peso del aceite crudo de microalga en base seca (Ver Figura 3-1(b)). El gasto energético de la extracción fue de 8.21 MW por kg de caldo de microalga. La suspensión resultante se filtró para separar la biomasa residual de los ácidos grasos extraídos. La corriente de los ácidos grasos que se filtro, se somete a un proceso de esterificación acida con acido sulfúrico y temperatura elevada de 70ºC. La reacción se efectuó con metanol en una relación molar de alimento de aceite a alcohol de 1:6, la cual es recomendada por la literatura (Darnoko, 2000; Freedman, 1984; Gryglewicz, 1999). La conversión de la reacción fue superior al 95%, para el caso, se fijo en un 98% de ácidos grasos (Chisti, 2007). Los productos fueron esteres metílicos de acido graso. La energía neta liberada en el reactor fue de 0.25 KW por Kg de caldo de microalga. Dada la gran cantidad de metanol alimentada, es muy útil recuperarlo,

para reutilizarlo o reciclarlo directamente al proceso, por ende, se utilizó una torre de destilación de 10 etapas, con especificaciones de una relación de reflujo molar de 2 y una relación de destilado a alimento de 0.99 molar. La ventaja de la destilación sobre una evaporación normal, es que se puede obtener por cima todo el metanol y agua procedentes del reactor, y dejar los metil ester de ácido graso por fondos. El calor neto del condensador total de la torre ascendió a -47.2 KW y el gasto de energía en el rehervidor fue 49.87 KW. Los esteres de acido graso libres de agua y metanol, se separaron en una columna cromatografica de gel de silica utilizando como solvente hexano-acetona consiguiéndose una recuperación de EPA ester, metil α-linoleniato, metil araquidoniato y DHA ester del 70%. (Belarbi, 2000; Cornieri, 1994). Se utilizaron los porcentajes de recuperación experimentales dentro de la simulación acoplada del proceso. La mezcla de los esteres de omega 3 se llevo a cabo en una torre de destilación para purificarlos y simultáneamente recuperar el solvente. Debido a la gran diferencia de puntos de ebullición, la destilación se realiza de forma fácil, especificándose la torre con 10 etapas con una relación de reflujo molar de 2 y una relación de destilado a alimento de 0.95 molar. Por cima se obtuvo todo el hexano de la corriente en una pureza del 100%. Por fondos se obtuvo una corriente de 0.996 Kg h^{-1} de esteres omega 3 rico en DHA en una pureza del 96.2% en peso lo cual es esperado y comparable con la pureza reportada en la literatura y superior al 90% en peso de DHA y/o EPA. (Belarbi, 2000; Cornieri, 1994). La cantidad de calor en el condensador de la torre equivalió a -1.39 KW, en tanto que en el rehervidor, el gasto de energía fue a 1.80 KW. Los esteres de acido graso que se separaron de los esteres de omega 3, también se purificaron para evaluar su potencial como producto y recuperar el solvente para su reutilización o reciclo inmediato al proceso**.** Para esto, se utilizó una torre de destilación de 10 etapas con una relación de reflujo molar de 2 y una relación de destilado a alimento de 0.86 molar. De forma similar a la torre de purificación de omega 3, el hexano se obtuvo por cima en su totalidad a una pureza del 100% y por fondos una corriente de 2.661 Kg h^{-1} de una mezcla de metil esteres libres de hexano rica en metil palmitato (28.5% en peso) y metil pentadeciclicato (38.6%). El flujo de calor en el condensador fue igual a -1.72 KW. La demanda de energía en el rehervidor fue 2.50 KW. La pasta de biomasa residual resultante del proceso de extracción de los metabolitos intracelulares del alga, se puede utilizar para la generación de energía eléctrica en la planta a través de la producción de gas de síntesis. Las reacciones de gasificación se efectúan en una combinación de reactores estequiométricos y de equilibrio (RStoic y REquil respectivamente). Se obtuvo una corriente de gas de síntesis de 5.042 Kg h^{-1} con una

composición en masa de 10.6% de CO_2, 14.6% de O_2, 73.5% de N_2, 756 PPM de CO, 28 PPM de CH_4, 0.6% de H_2 y 0.6% de H_2O.

La evaluación ambiental del proceso mediante el algoritmo WAR mostró que la extracción con solventes y ruptura celular tuvieron un Índice de Potencial Ambiental de salida de emisiones (PEI) por Kg de producto de 7.76E-2 y 8.137E-3, respectivamente. Al contemplar la generación de emisiones de proceso, el PEI por Kg de producto fue de -14.53 y -4.791 para la extracción con solventes y para la ruptura celular respectivamente. En la Figura 3-3 se observa los resultados de la evaluación ambiental por categorías.

Discusión: la influencia del método de extracción en la biorefinería a partir de microalgas se vio reflejada a nivel de ingeniería de procesos, en los rendimientos de producto y demanda energética (Figura 3-2).

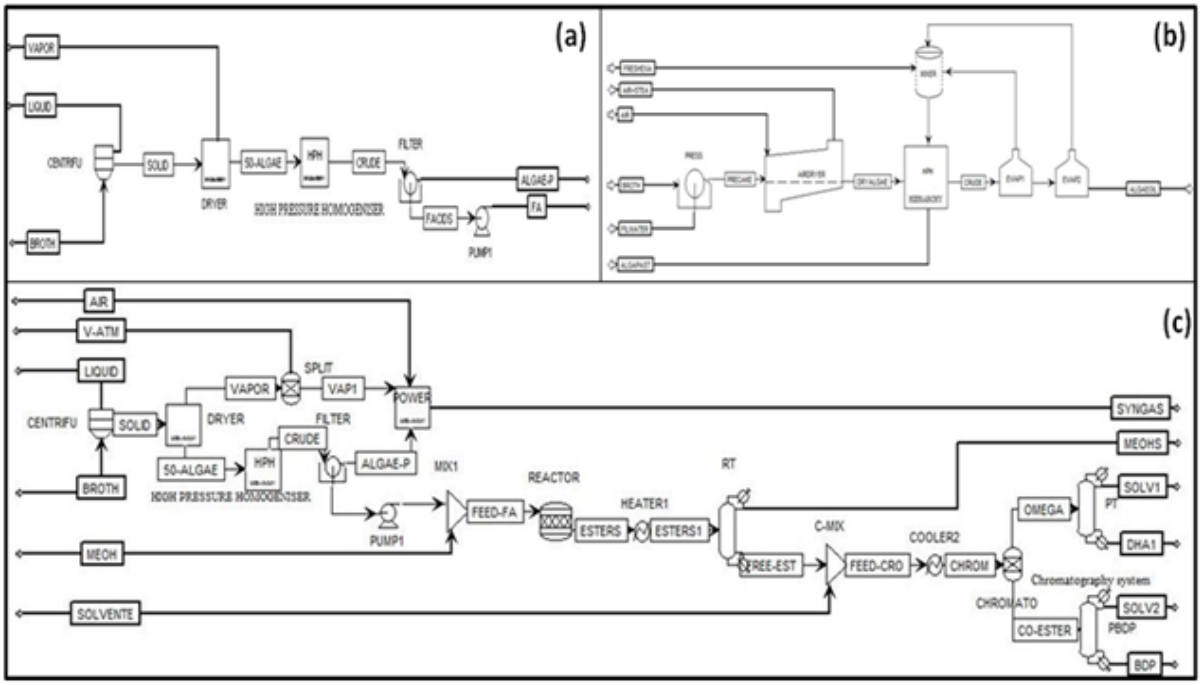

Figura 3-1: (a) Diagrama de flujo de extracción por ruptura celular para microalga Schizochytrium sp N-2**. (b)** Diagrama de flujo extracción por solventes para la microalga Schizochytrium sp N-2. **(c)** Diagrama de flujo de Biorefinería a aprtir de micraoalga Schizochytrium sp N-2

El análisis de los rendimientos del proceso (Figura 3-2(a)) reveló que la extracción por ruptura celular es más favorable que la extracción por solventes para la producción de biodiesel y omega 3, debido al aprovechamiento de la mayor parte de la biomasa de

microalga *Schizochytrium* sp. N-2 hacia aceite, alrededor del 90% en comparación a la extracción con solventes que es de alrededor del 70%. Sin embargo, los productos por extracción con solventes resultaron tener mayor pureza, aunque los productos por ruptura celular se encuentran en los estándares de producción.

El biodiesel obtenido tuvo una viscosidad de 17.61 mm^2/s a 40ºC, que resulto mayor que la del biodiesel estándar (3.5-5 mm^2/s a 40ºC) (Ver Tabla 3-1.). Debido a esto los ácidos grasos esenciales obtenidos de esta cepa de alga, no serian adecuados para producir biodiesel combustible porque los ácidos grasos con más de 4 dobles enlaces como en el caso de EPA y DHA tienen a sufrir reacciones de oxidación, haciendo que baje la calidad del biodiesel. Este problema se puede solucionar con una hidrogenación catalítica parcial del aceite crudo antes de ser procesados o utilizar el biodiesel en mezclas B2 o B5 para motores diesel de media y baja velocidad. Sin embargo, es muy importante resaltar que el aceite de esta microalga *Schizochytrium* sp. N-2 tiene una viscosidad cinemática alta (37.23 mm^2/s a 40°C) y que el proceso de transesterificación para convertir el aceite a biodiesel, logra reducir 2.11 veces la viscosidad del aceite.

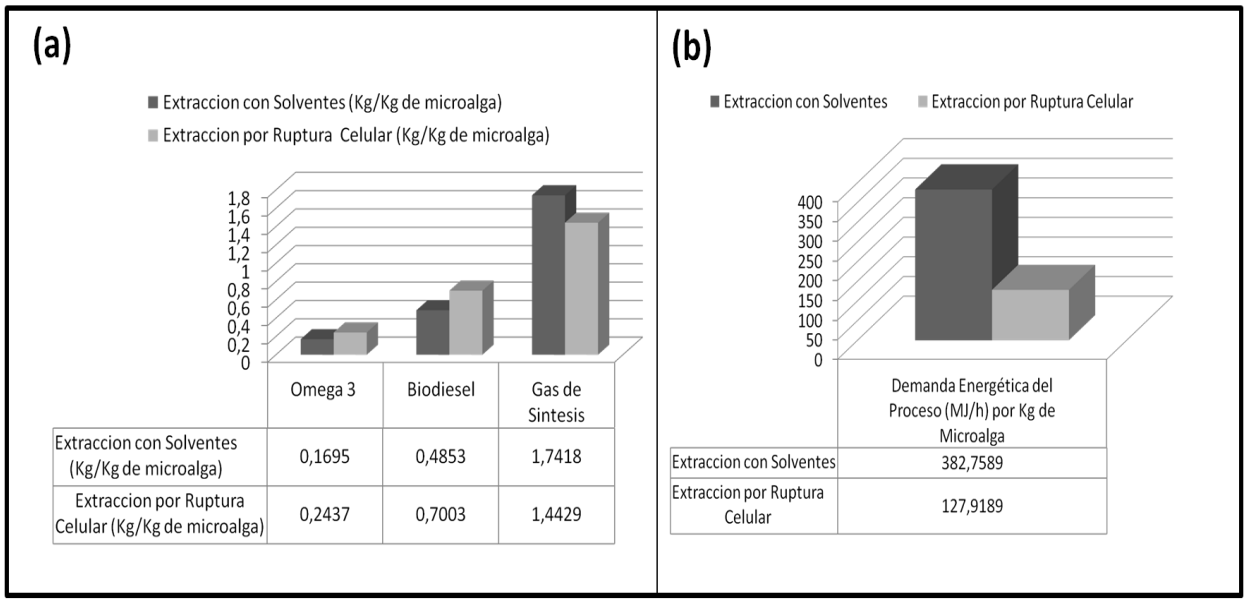

Figura 3-2: (a) Rendimientos de proceso en una Biorefinería a partir de microalga *Schizochytrium* sp. N-2**. (b**) Demanda Energética de Biorefinería a partir de microalga *Schizochytrium* sp. N-2.

El análisis energético (Figura 3-2 (b)) reveló que el secado por aire en el esquema de extracción con solventes demandó mayor energía que el secado solar en el esquema de

ruptura celular, aproximadamente 3 veces mayor, siendo una de las etapas en el pretratamiento de la biomasa de microalgas que requieren mayor exploración tecnológica debido a sus costos energéticos.

El análisis de impacto ambiental de los procesos (Figura 3-3) reveló que el esquema de biorefinería de extracción con solventes tuvo una salida de emisiones o descarga al ambiente mayor a la del esquema por ruptura celular, debido a la presencia del solvente hexano y del metanol sobre las aguas de residuo en pequeñas cantidades; haciendo que aumente la carga ambiental, especialmente en los índices de potencial de calentamiento global y acidificación. Sin embargo, al analizar la generación de emisiones, el PEI más positivo lo posee el esquema de biorefinería con lisis celular, haciendo más amigable con el ambiente al esquema con extracción con solventes, dado que la materia prima que se emplea en todo el proceso se recircula o se convierte en productos de alto valor agregado, disminuyendo el impacto ambiental nocivo debido a que no sale del sistema conforme a la metodología empleada por el software WAR GUI en su predicción del impacto ambiental del proceso.

Tabla 3-1: Comparación del biodiesel estándar con el biodiesel obtenido.

Propiedad	Biodiesel Estándar EN 14214	Biodiesel de Alga *Schizochytrium* sp. N-2.
Densidad a 15ºC (g cm^{-3})	0.86-0.9	0.86
Viscosidad a 40ºC (mm^2 s^{-1})	3.5-5	17.61
Contenido de Agua (ppm)	<500	Traza
Metanol (% en peso)	<0.2	Traza
Ester (% en peso)	>96.5	99.99

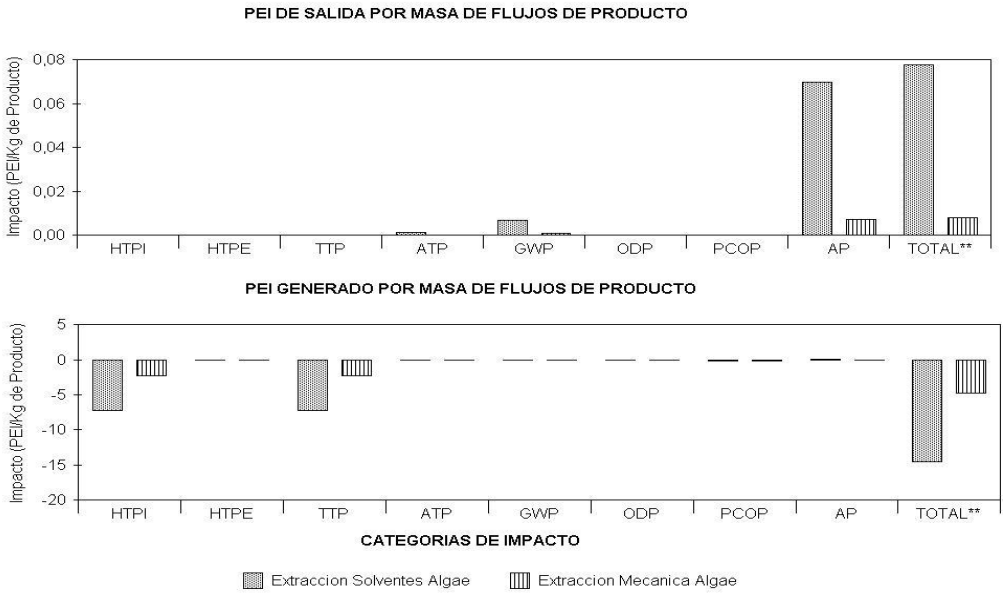

Figura 3-3: Evaluación ambiental de la Biorefinería a partir de microalga *Schizochytrium* sp. N-2.

3.1.2 Conversión Termoquímica para la producción de energía eléctrica a partir de Biomasa de microalgas *Schizochytrium* sp. N-2.

En el presente escenario se muestra una pequeña revisión de los métodos de transformación termoquímica de la biomasa de microalgas y se comparan dos alternativas de producción de energía eléctrica a partir de la pasta y el aceite de microalga *Schizochytrium* sp. N-2. La simulación se realizó en software comercial ASPEN PLUS 2006.5 tomando como base de cálculo 1 ton h^{-1} de caldo de cultivo de biomasa crecida de microalga con una concentración de 3.8 Kg m^3. Se obtuvo que la potencia eléctrica producida a partir de la combustión directa del aceite de microalga es de 6.79 KW, casi 6 veces mayor a la potencia producida por la gasificación de la pasta de microalga (1.17 KW). El poder calorífico inferior del gas de combustión del aceite de microalga obtenido fue de 26.82 MJ Kg^{-1} de aceite. Al comparar con la potencia eléctrica generada a partir del bagazo y la paja de caña y de sorgo, la biomasa de microalga *Schizochytrium* sp. N-2., ofrece un rendimiento energético superior que hace factible la sostenibilidad energética de una biorefinería.

Las tecnologías de conversión para la utilización de la biomasa de microalgas se dividen en dos categorías: la conversión termoquímica y la bioquímica (Figura 3-4). Los factores más influyentes para escoger una u otra dependen principalmente del tipo y la cantidad de biomasa, la forma deseada de energía, consideraciones económicas y el fin del producto obtenido.[70].

Transformación termoquímica: La conversión termoquímica abarca todos los procesos de descomposición de los compuestos orgánicos en la biomasa a productos combustibles. Se destacan la combustión directa, gasificación, licuefacción termoquímica y pirolisis.

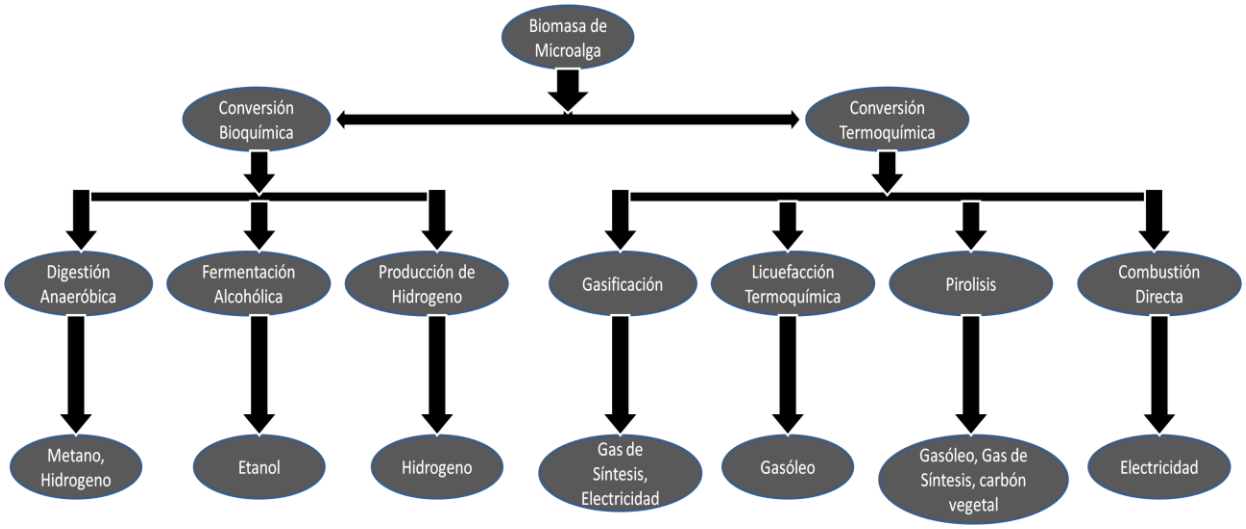

Figura 3-4: Procesos de Conversión de Biomasa de Microalga. (Adaptado de Brennan y Owende [28])

Combustión directa: En el proceso de combustión directa, la biomasa es quemada en presencia de aire para convertir la energía almacenada dentro de ella en gases calientes. Dicha operación se realiza en hornos, quemadores y turbinas de ciclo combinado de gas y vapor a temperaturas de alrededor de 800ºC. La humedad aconsejable para garantizar la conversión es menor a 50% en peso seco. La energía producida durante el proceso va desde escalas domesticas a escalas industriales, entre 100-300 MW. Las desventajas de esta tecnología son los procesos de pretratamiento a los cuales se debe someter la biomasa, como el secado en el caso de las algas, que demanda una gran cantidad de energía y costo. [28].

Licuefacción termoquímica: Las microalgas con gran cantidad de humedad, son una materia prima ideal para la licuefacción hidrotérmica en condiciones de agua subcrítica para convertir la biomasa mojada en materiales moleculares de alta densidad energética (combustibles líquidos). [178].

La licuefacción termoquímica es un proceso que se lleva a cabo a bajas temperaturas (300-350ºC) y altas presiones (5-20MPa) en presencia de un catalizados gaseoso como hidrogeno o monóxido de carbono [86]. Diversos estudios han revelado el potencial de las microalgas como materia prima para la licuefacción termoquímica, encontrándose que la *B. braunii* tiene un rendimiento máximo a aceite de 64% en base seca, con un potencial calorífico de 45.9 MJ Kg^{-1} y la *Dunaliella tertiolecta* de 42% en base seca a aceite con un poder calorífica de 34.9 MJ Kg^{-1} [110].

Pirólisis: La pirolisis es la conversión de biomasa a biocombustibles, carbón y fracciones gaseosas por calentamiento de la biomasa en ausencia de aire o catalizada a 500ºC aproximadamente a una tasa de calentamiento alta (10^3-10^4 K s^{-1}) y con un tiempo de residencia de craqueo gaseoso corto. Las moléculas de cadena corta formadas, se enfrían rápidamente a líquidos combustibles [179]. Estudios recientes, se han enfocado en la pirolisis rápida para la incrementar el rendimiento de la producción de biocombustibles líquidos. La pirolisis instantánea es usada para convertir la biomasa a biocrudo alcanzando una conversión del 80% [180]. Debido al alto contenido de humedad de las algas, un proceso de secado se hace necesario, sin embargo, este proceso demanda gran cantidad de energía[181]. Comparando ambas tecnologías, los tiempos de residencia de la pirolisis rápida e instantánea son de 10-20 s y 1 s respectivamente. Los productos esperados para la pirolisis instantánea es de 75% de líquidos, 2% de carbón y 13% de gases; y para la pirolisis rápida es de 50% de líquidos, 20 % de carbón y 30% de gases, razón por la cual, la pirolisis instantánea es adecuada para la conversión de la biomasa a biocombustibles líquidos. [182].

Gasificación: La gasificación es un proceso por el cual la biomasa es convertida a gas de síntesis por medio de la oxidación parcial con aire, oxígeno, y/o vapor a altas temperaturas, típicamente en el rango de 800-900ºC. [183]. La ventaja de la gasificación como una vía de biomasa a energía es que puede producir gas de síntesis de una gran variedad de materias primas. El gas de síntesis es un gas de bajo poder calorífico (4-6

MJ m^{-3}) que puede ser directamente quemado para producir electricidad o usado como combustible de turbinas de gas. [184].

Las características de la gasificación de la biomasa de microalgas se está estudiando en la actualidad con gran énfasis, un ejemplo es la *Spirulina* a gasificada a 1000ºC que produce un rendimiento de 0.64 g de metanol por 1 g de biomasa. El balance de energía del proceso es marginalmente positivo, siendo de 1,1 (relación de metanol producido a energía total requerida), lo cual se explica debido al alta demanda energética del pretratamiento de la microalga (centrifugación y secado). [185].

La simulación se realizó en software comercial ASPEN PLUS 2006.5 tomando como base de cálculo 1 ton h^{-1} de caldo de cultivo de biomasa crecida de microalga *Schizochytrium* sp. N-2 con una concentración de 3.8 Kg m^3. El modelo utilizado fue NRTL-HOC debido a la presencia de ácidos orgánicos en el proceso. Las propiedades de las sustancias involucradas en la simulación se calcularon mediante el modelo para predicción de propiedades de moléculas complejas de Marrero-Gani, la base de datos NIST y el modelo UNIFAC-DMD, validadas con datos experimentales. El aceite obtenido es rico en DHA (36.1%) un acido graso esencial del grupo omega 3, el acido pentadecíclico (28.7%) y acido palmítico (21.3%). La simulación se realizo sin ninguna consideración aproximada, contemplando un diseño de proceso riguroso y ajustado a lo reportado en la literatura. Se simuló la combustión directa del aceite de microalga y se comparo con la simulación de la gasificación de la pasta de microalga, ambas para la producción de energía eléctrica utilizando ciclos de vapor. El diagrama de flujo de proceso para cada uno, se observa en la Figura 3-5 y Figura 3-6.

Resultados: Los resultados de ambas simulaciones se confrontan en la Tabla 3-2. Se puede observar que la potencia eléctrica producida a partir de la combustión directa del aceite de microalga es de 6.79 KW, casi 6 veces mayor a la potencia producida por la gasificación de la pasta de microalga (1.17 KW). El poder calorífico inferior del gas de combustión del aceite de microalga *Schizochytrium* sp. N-2., resulta de 26.82 MJ Kg^{-1} de aceite.

Discusión: Al analizar los procesos de generación de energía eléctrica a partir de la combustión directa del aceite y la gasificación de la pasta de microalga *Schizochytrium*

sp. N-2., es que claro el primero produce 5.73 veces más potencia energética que el segundo (Tabla 3-2.). Sin embargo, el flujo de aire en la combustión directa es superior, y a él, se asocian los gastos de compresión del proceso, lo cual disminuye en casi la mitad la energía disponible haciendo que la otra parte de la energía se concentre en solventar la demanda energética del esquema de producción.

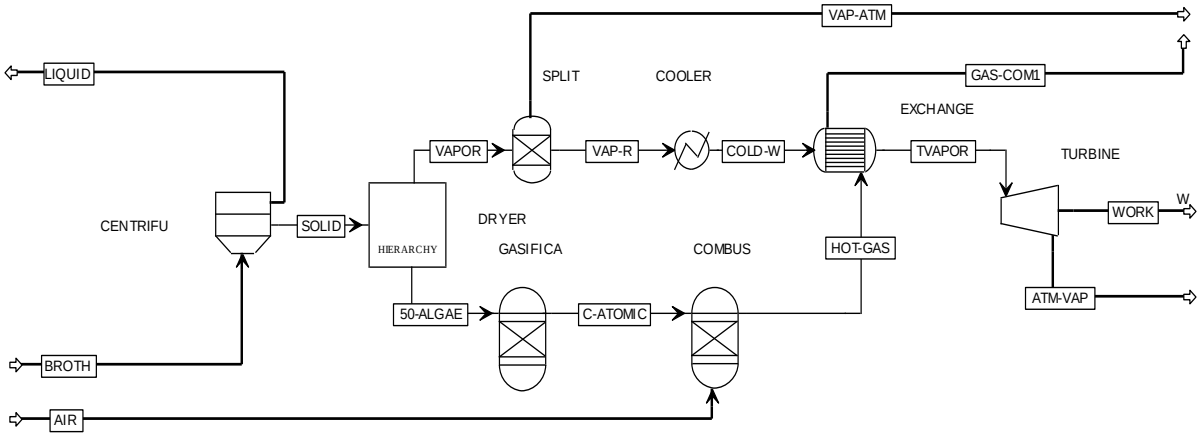

Figura 3-5: Diagrama de flujo de proceso de producción de energía eléctrica a partir de la gasificación de biomasa de microalga *Schizochytrium* sp. N-2.

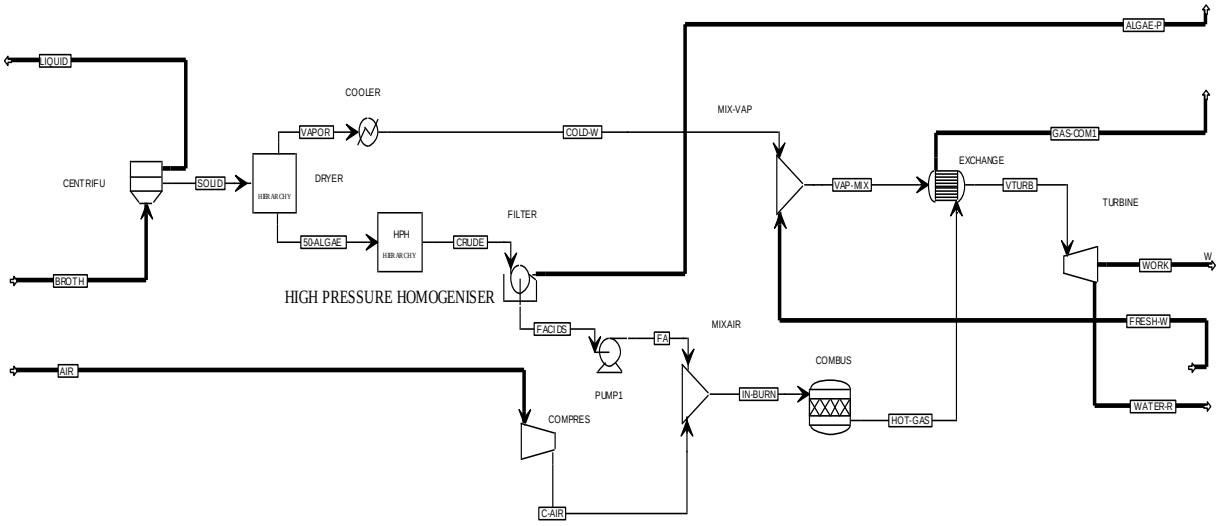

Figura 3-6: Diagrama de flujo de proceso de producción de energía eléctrica a partir de la combustión directa de aceite de microalga *Schizochytrium* sp. N-2.

Al comparar con la potencia eléctrica generada a partir del bagazo y la paja de caña, y el bagazo y la paja de sorgo, la biomasa de microalga *Schizochytrium* sp. N-2., ofrece un rendimiento energético superior que hace factible la sostenibilidad energética de un proceso integrado de biorefinería para la obtención de productos de alto valor agregado a partir de microalgas (Ver Tabla 3-3).

Tabla 3-2: Comparación de los procesos de combustión directa y gasificación de microalga *Schizochytrium* sp. N-2.

Combustión Directa de Aceite		Gasificación de Pasta	
Materia Prima	**Flujo**	**Materia Prima**	**Flujo**
Caldo de Cultivo	1003.8 Kg h^{-1}	Caldo de Cultivo	1003.8 Kg h^{-1}
Microalga	3.8 Kg h^{-1}	Microalga	3.8 Kg h^{-1}
Agua	1000 Kg h^{-1}	Agua	1000 Kg h^{-1}
Aire	43.638 Kg h^{-1}	Aire	25.296 Kg h^{-1}
Productos	**Flujo**	**Productos**	**Flujo**
Gases de Combustión	50.884 Kg h^{-1}	Gas de Combustión	29.288 Kg h^{-1}
Vapor Generado	50.357 Kg h^{-1}	Vapor Generado	10.096 Kg h^{-1}
Potencia Eléctrica	6.78943 KW	**Potencia Eléctrica**	1.16998 KW

Tabla 3-3: Comparación de diferentes materias primas para la producción de energía*.

	Bagazo de Caña[a]	Paja de Caña[a]	Bagazo de Sorgo[a]	Paja de Sorgo[a]	Aceite de Microalga[b]	Pasta de Microalga[b]
Biomasa Alimentada (Kg h^{-1})	69444.5	619.958	86805.5	1458.33	3.8	3.8
Rendimiento Energético (MJ Kg^{-1})	0.37	4.70	0.35	2.32	6.43	1.11
Potencia Eléctrica[c] (MW)	0.37	4.70	0.35	2.32	6.43	1.11

[a] Tomado de [186]

[b] Este trabajo

[c] Tomando como base de cálculo 1 Kg s^{-1} de biomasa en base seca.

* Se decide comparar entre estas materias primas debido a su contenido lignocelulósico y potencial de cogeneración energética.[187]

Las posibilidades se amplían más si se considera que los gases de combustión resultantes se pueden recircular como sustrato y nutrientes al momento de cultivar las microalgas por cualquier método, ya sea abierto o cerrado, haciendo del proceso un ciclo cerrado y conveniente que aprovecha todos los recursos generados dentro del mismo.

Al comparar los poderes caloríficos inferiores de varios aceites, se puede observar en la Tabla 3-4 que el aceite de microalga *Schizochytrium* sp. N-2., es el que tiene el valor más pequeño, sin embargo, se encuentra en el mismo orden de magnitud de dichos aceites e incluso llega a ser superior al de otras materias primas, justificando su utilización como agente combustible.

Tabla 3-4: Potenciales caloríficos de varias sustancias. (Tomado del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España)

Sustancia	Poder calorífico Inferior (MJ Kg^{-1})
Aceite de Algodón	37.2
Aceite de lino	37.2
Aceite mineral	42.0
Aceite de oliva	42.0
Aceite de parafina	42
Etanol	25.1
Fibra de Coco	25.1
Madera	16.7
Petróleo	42
Aceite de Microalga	26.8*

* Este Trabajo: calculado a partir de balances de materia y energía durante la combustión directa del aceite (En la literatura no se encuentra dicha medida experimental).

3.1.3 Biorefinería a partir de cascarilla de arroz: Producción de energía eléctrica y CO_2 como sustrato para el cultivo de Microalgas

En este caso se evaluó técnica, energética y ambientalmente una biorefinería a partir de cascarilla de arroz con el fin de producir energía eléctrica, gases de combustión ricos en CO_2 apto para el cultivo de microalgas como sustrato, ceniza de cascarilla con alto contenido de sílice con potencial para Biocompositos en la industria de la construcción. Los balances de materia y energía se resolvieron en el software Aspen Plus v7.2 utilizando una base de cálculo de 914 Kg/h de cascarilla de arroz, la evaluación ambiental se realizó empelando el algoritmo de reducción de residuos WAR. Se obtuvo un rendimiento energético de 975.6 KW por Kg/s de cascarilla de arroz alimentada con un balance de energía positivo de 1:15., y un rendimiento de 1.6 Kg de CO_2 por kg de cascarilla alimentada. El potencial de impacto ambiental de salida resulta de 9E-6 PEI/kg de productos, que demuestra que la integración másica del escenario convierte al proceso en un lazo cerrado de emisiones muy bajas.

La simulación del proceso se realizó utilizando el software comercial ASPEN PLUS v7.2 tomando como base de cálculo 914 kg/h de cascarilla de arroz alimentada. Se utilizó los análisis último y próximo (ver tabla 3-5) para caracterizar la cascarilla de arroz como un compuesto no convencional dentro del simulador. El modelo termodinámico para realizar el cálculo de las propiedades de componentes puros y de mezcla dentro de las corrientes en el diagrama de flujo de proceso (ver figura 3-7) fue NRTL para la fase liquida con la corrección de Hayden O'Connell para la fase de vapor debido a la presencia de ácidos orgánicos volátiles. La evaluación de impacto ambiental se realizo en el software de la FAO, WAR GUI, considerando el PEI generado y de salida de proceso.

Resultados: El diagrama de flujo de proceso final (ver figura 3-7) se obtuvo integrando másicamente todas las corrientes de fluido. Se redujo la el porcentaje de humedad de la cascarilla de arroz en una unidad dryer de Aspen Plus con aire seco a condiciones atmosféricas, el cual se deshumidicó posteriormente para ser usado en la unidad de gasificación y dicha agua removida para ser utilizada como fluido de servicio en las unidades de intercambio de calor. La cascarilla de arroz se sometió a un proceso de reducción de diámetro de partícula para aumentar el área superficial de la cascarilla y

con esto, mejorar la gasificación de la misma. La corriente de salida del gasificador contiene gas de síntesis a una temperatura de 800°C. Las cenizas e impurezas del gas de síntesis se separan en un filtro de gases los gases se ingresan a una caldera para generar vapor de alta presión a 11.6 bar utilizando el agua que resultó del proceso de deshumidicación del aire de salida del secador. Las cenizas de la cascarilla de arroz por tener un contenido alto de sílice, calcio y fósforo se consideran un producto dentro del esquema, debido a su potencial en la industria cementera. El gas de síntesis frío de salida de la caldera se somete a una oxidación completa para generar gases de combustión calientes a 800°C y con una carga de CO_2 alta, los cuales se aprovechan para generar más vapor de alta presión en otra unidad de intercambio de calor. Las corrientes de vapor se mezclan y se ingresan a una turbina para generar energía eléctrica y debido a que los vapores salen en equilibrio liquido vapor con una calidad mayor al 90%, se condensan, y se recirculan al proceso como agua de servicio. Los gases de combustión fríos debido a su contenido alto de CO_2 se consideran ideales para un proceso que tome esta corriente como materia prima, en el caso del cultivo de microalgas, son un sustrato que no implica costos de materia prima mayores, como compra o transporte dado que es un residuo que usualmente es ventilado por las industrias.

Tabla 3-5: Análisis último y próximo de la cascarilla de arroz en Colombia. [188]

Análisis Ultimo							**Análisis Próximo**	
Humedad	C	H	O	N	S	Ceniza	Elemento	%
8.6	42.5	6.0	36.2	0.21	0.49	14.6	Carbón fijo	16.67
8.9	39.1	5.2	37.2	0.27	0.43	17.8	Cenizas	17.89
9.4	33.4	4.3	38.5	0.38	0.32	23.1	Volátiles	65.47

Se obtuvo un rendimiento energético de 975.6 KJ, 1.6 Kg de CO_2 y 0.13 kg de ceniza por Kg de cascarilla de arroz alimentada en cada caso.

El potencial de impacto ambiental obtenido se puede observar en las figuras 3-8 y 3-9 incluyendo y sin incluir los productos en dicha evaluación.

Tabla 3-6: Balance de materia y energía de la biorefinería de cascarilla de arroz

Materia prima	**Flujo (Kg/h)**
Cascarilla de Arroz	914
Aire	5060.6
Productos	**Flujo (Kg/h)**
Gases de combustión	5807.668
Ceniza de cascarilla	116.443
Agua con nutrientes	1599.803
Energía	**Flujo (KW)**
Electricidad	271.131

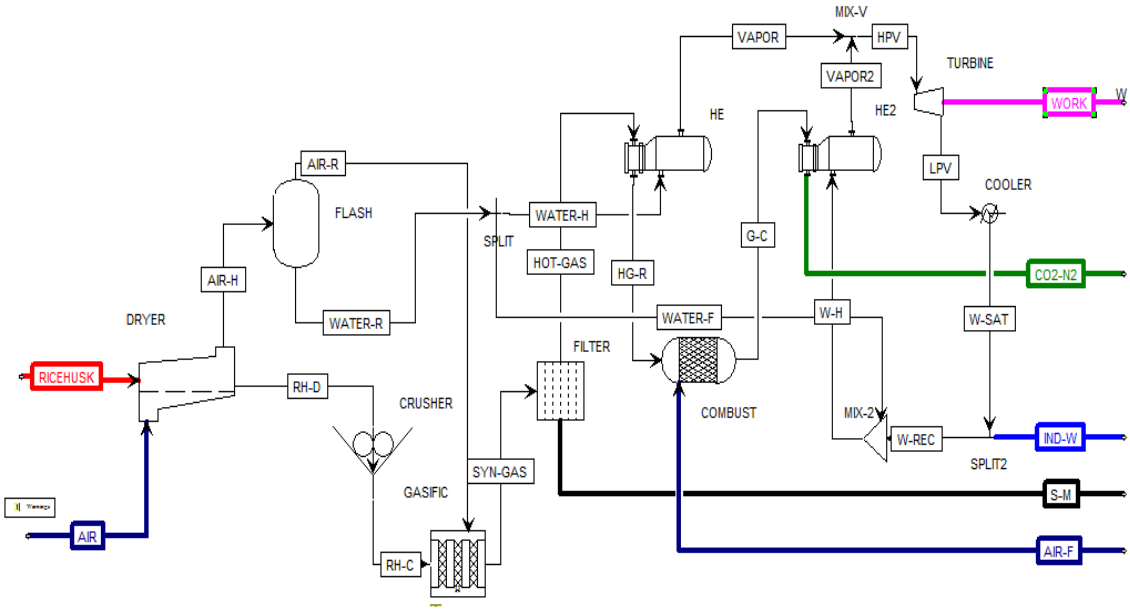

Figura 3-7: Diagrama de flujo de proceso de una biorefinería a partir de cascarilla de arroz

Discusión: se puede observar que la cascarilla de arroz tiene un gran potencial en el panorama de una biorefinería sostenible, debido a que en el contexto colombiano, y debido a la gran demanda de producción de arroz (2'099.195 Ton al 2012 según la Federación Nacional de Arroceros en Colombia), este residuo lignocelulósico se acumula

y si bien, parte de este se utiliza de forma doméstica en las empresas para generar vapor, su cantidad hace que las empresas opten por quemarlo.

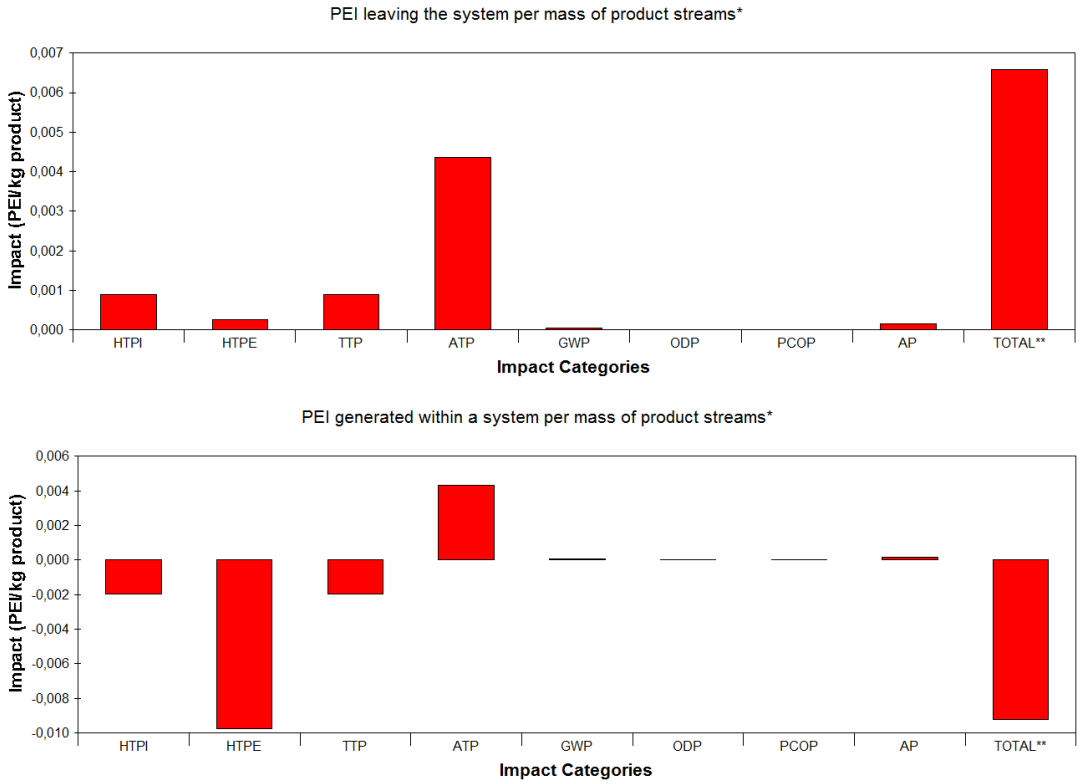

Figura 3-8: Análisis de impacto ambiental del escenario considerando todas las corrientes como residuo

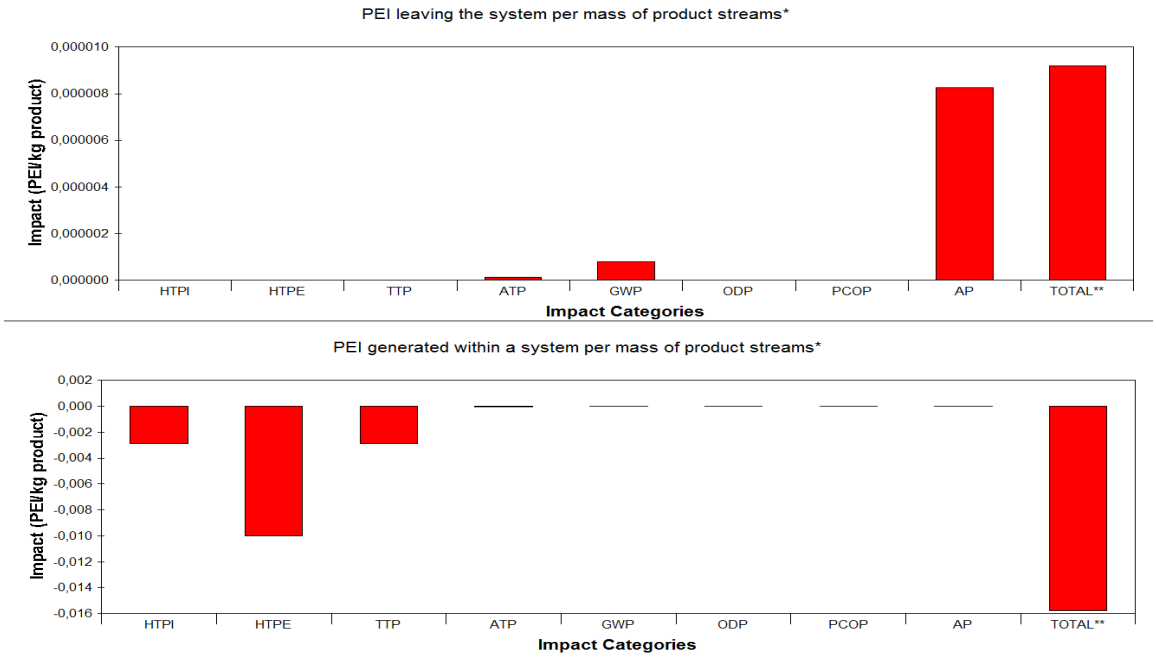

Figura 3-9: Análisis de impacto ambiental del escenario sin considerar los productos

Si éste residuo, se utilizará dentro de un ciclo combinado de generación de energía eléctrica o cogeneración mediante métodos de gasificación y combustión directa como se contempla en este escenario, su potencial hacia una biorefinería sostenible es inmenso dado que su balance de energía es positivo, por 1 KW de energía que demanda el proceso, éste genera 15 KW con un rendimiento de 975.6 KW por cada Kg/s de cascarilla de arroz alimentado. La ventaja de aprovechar los gases de combustión generado en el proceso como sustrato y materia prima para el cultivo y crecimiento de biomasa de microalgas, sumado al aprovechamiento de la ceniza como compuesto útil en la producción de Biocompositos o aditivo en la industria del cemento, convierte a este proceso en un lazo cerrado con emisiones de salida casi nulas. Este hecho se puede ver reflejado en el análisis de impacto ambiental del proceso, donde el potencial de impacto ambiental (PEI) total de salida (ver Figura 3-9) es de $8*10^{-8}$ PEI/kg de productos. La fortaleza de esta biorefinería se logra comprender desde la óptica de la integración másica, en la cual, todas las corrientes de proceso son aprovechadas dentro de un ciclo cerrado de aprovechamiento de fluidos. Si se contempla el proceso analizando el potencial de impacto ambiental incluyendo los productos como corrientes de desecho, es decir, asumiendo que la corriente de gases de combustión se emiten al ecosistema, las cenizas se vierten a la tierra (ver **Figura 3-8**) el PEI total de salida demuestra que las

corrientes afectarían la fauna acuática, terrestre y humana debido a la carga de sustancias nocivas en las aguas de desecho, y el potencial de calentamiento global se marca debido al escape de gases de efecto invernadero.

Un gran impacto adicional resulta de este proceso, ya que como se ha mencionado durante la contextualización de la producción de biocombustibles a partir de microalgas, la etapa de secado en el cultivo de estos microorganismos es la etapa más costosa ya que demanda mayor cantidad de energía, y como consecuencia de este escenario, la energía generada, se puede utilizar para suplir en parte la demanda energética del secado del caldo de microalgas, adicional a la energía suplida en las etapas de interenfriamiento contempladas en el escenario de cultivo que se describirá más adelante.

3.1.4 Modelación y simulación del cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris*.

Se evaluó técnica, económica y ambientalmente el cultivo, recolección, secado y extracción de metabolitos de la microalga *Chlorella Vulgaris*. Como sustrato se tomo una corriente de gases de combustión con gran cantidad de CO_2 proveniente del escenario de una biorefinería de cascarilla de arroz. Se dimensiono el proceso para una producción de 1 ton/h de aceite de microalga. Se resolvieron los balances de materia y energía en ASPEN PLUS, la evaluación económica en Aspen Process Economic Analyzer, y la evaluación de impacto ambiental mediante el algoritmo de reducción de residuos WAR. Se obtuvo un rendimiento de 37 % Kg de aceite y 63 % kg de pasta por kg de biomasa de microalga en base seca, con una demanda de energía neta de 3.7 MJ por kg de biomasa de alga seca y una energía de intercambio de 3.2 MJ por kg de microalga seca. Los costos de producción de 1 Kg de aceite y de pasta obtenidos son UDS 0.56 y USD 0.33 respectivamente. El potencial de impacto ambiental de salida calculado resulta de 0.003 PEI/Kg de productos con una considerable mitigación del potencial de formación de smog debido al aprovechamiento de los gases de combustión y posterior transformación en metabolitos de alto valor agregado.

La simulación del proceso se realizó mediante el simulador ASPEN PLUS v7.2 para obtener los balances de materia y energía del escenario. Debido a que el proceso cuenta en sus corrientes con componentes no convencionales como la biomasa de microalgas, y los triglicéridos que componen el aceite, se utilizó la metodología de Marrero-Gani y la NIST para ingresar las propiedades dentro del simulador. Se eligió como herramienta de predicción de las propiedades de flujo de corrientes el modelo termodinámico de NRTL Hayden-O'Connell debido a la presencia de gases orgánicos volátiles en la fase de vapor que sufren dimerización y que otros métodos como el UNIFAC y sus modificaciones dentro del simulador no son capaces de predecir de manera correcta. La evaluación económica se realizó mediante el paquete Aspen Process Economic Analyzer en el contexto colombiano conforme se estipulo en la metodología con datos e índices de costos actualizados al año 2011. La evaluación ambiental del proceso se realizó con el software WAR GUI contemplando las 8 categorías de impacto de interés en este estudio y que se describieron detallamente en la metodología general abordada.

Resultados: El diagrama de flujo de proceso realizado para este escenario (ver Figura 3-10) se diseño en base a los criterios propuestos por M. El-Halwagi 2010 [189]. Una corriente de gases de combustión interconectada de una biorefinería a partir de cascarilla de arroz se purifica para enriquecer el CO_2 presente y alimentarse a un fotoreactor de crecimiento de microalgas. Se propone un tren de compresión y enfriamiento por etapas para llevar los gases de combustión a la presión adecuada para absorber el dióxido de carbono en agua. La presión de entrada de los gases de combustión al final del tren de interenfriamiento es de 20 bar, según lo sugerido por M. El-Halwagi 2010 [189]. Esta presión tan alta, asegura una correcta separación del CO_2 del seno de gases de combustión. Cabe anotar que la energía de intercambio de esta zona se usara posteriormente para suplir los gastos energéticos del secado de la biomasa algal. La cantidad de CO_2 asegura una producción de alrededor de una tonelada por hora de aceite como base de cálculo para los procesos de producción e biodiesel. La corriente de agua carbonatada emergente del proceso de absorción se alimenta junto con los nutrientes necesarios para el cultivo de microalga *Chlorella Vulgaris* a un fotoreactor con una relación de reciclo de biomasa de 0.12 para asegurar un tiempo de residencia de 24 h en el crecimiento de biomasa. La corriente emergente se somete a un proceso de centrifugación para separar el caldo de la biomasa, y se seca para reducir el contenido de humedad de la biomasa alrededor del 12% en peso. Los requerimientos energéticos

de secado por aire en túnel se suplen por completo por la energía de intercambio en el tren de interenfriamiento. La biomasa seca se ingresa a una unidad de extracción con solventes, donde el hexano extrae los aceites de la microalga y de residuo se engendra una pasta rica en almidón, proteínas y fibra.

Lo balances de materia y energía del proceso se observan en la Tabla 3-7. Los rendimientos de proceso calculados a partir de este son de **0.37 Kg de aceite y 0.63 kg de pasta por kg de biomasa de microalga en base seca**, con una demanda de energía neta de 3.7 MJ por kg de biomasa de alga seca y una energía de intercambio de 3.2 MJ por kg de microalga seca.

En la Tabla 3-8 se reportan los costos de producción de la pasta y el aceite de microalga. Los rendimientos económicos resultan ser de USD 0.56 por Kg de aceite en base seca y USD 0.33 por kg de pasta de microalga en base seca. En la Figura 3-11 se observa un diagrama porcentual donde se visualiza la distribución económica del costo de producción del esquema de cultivo y extracción planteado en este escenario.

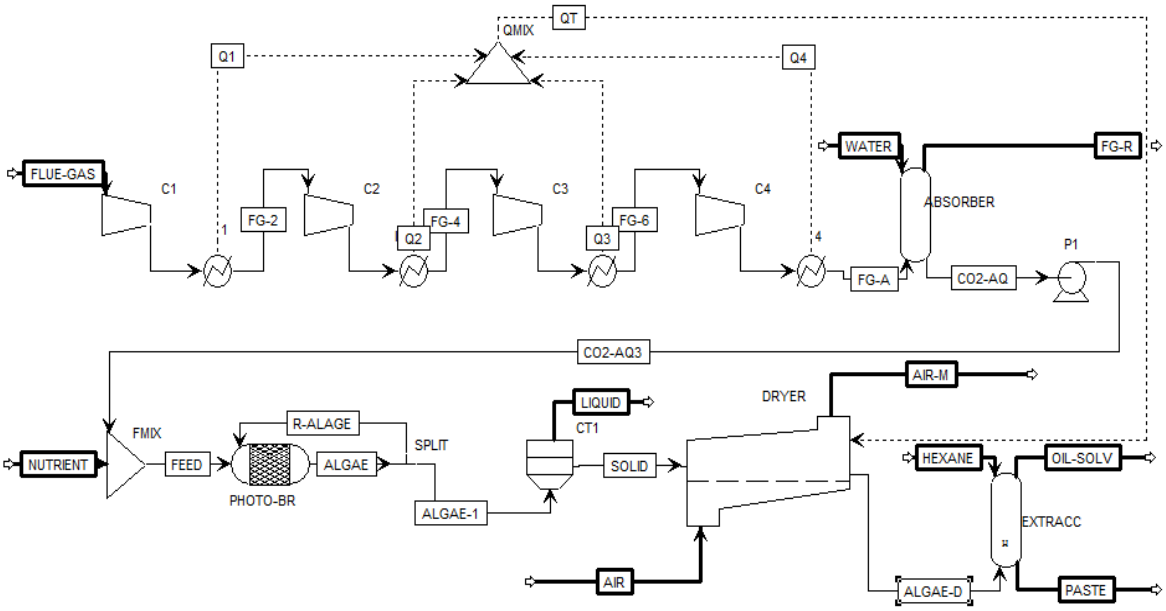

Figura 3-10: Diagrama de flujo de proceso de cultivo y extracción de metabolitos de microalga *Chlorella Vulgaris*

Tabla 3-7: balances de materia y energía del cultivo de microalga *Chlorella Vulgaris*

Materia Prima	**Flujo (Kg/h)**
Gases de combustión	8621
Agua	9500
Nutrientes	108.301
Aire	100000
Solvente hexano	12312.618
Productos	**Flujo (Kg/h)**
Aceite de microalga	347.382
Pasta de microalga	593.105
Aire humidificado	100752.390
Solvente recuperado	12312.618
Gases emitidos	6403.134
Caldo libre de células	10132.238
Energía	**Flujo (MJ/h)**
Energía de intercambio	3479.8
Demanda de energía	3009.6

Tabla 3-8: evaluación económica del cultivo y extracción de metabolitos de la microalga Chlorella Vulgaris

Categoría	**Costo (USD/Kg*)**
Materias primas	0,104871345
Fluidos de servicio	0,033327604
Costos de operación y mantenimiento	0,033369479
Cargos operacionales	0,003638939
Gastos indirectos de la planta	0,01668474
Costos generales y administrativos	0,015351393
Costo total	0,2072435
Costo total de aceite	0,560117567
Costo total de la pasta	0,328957936

*. Biomasa de microalga total en base seca

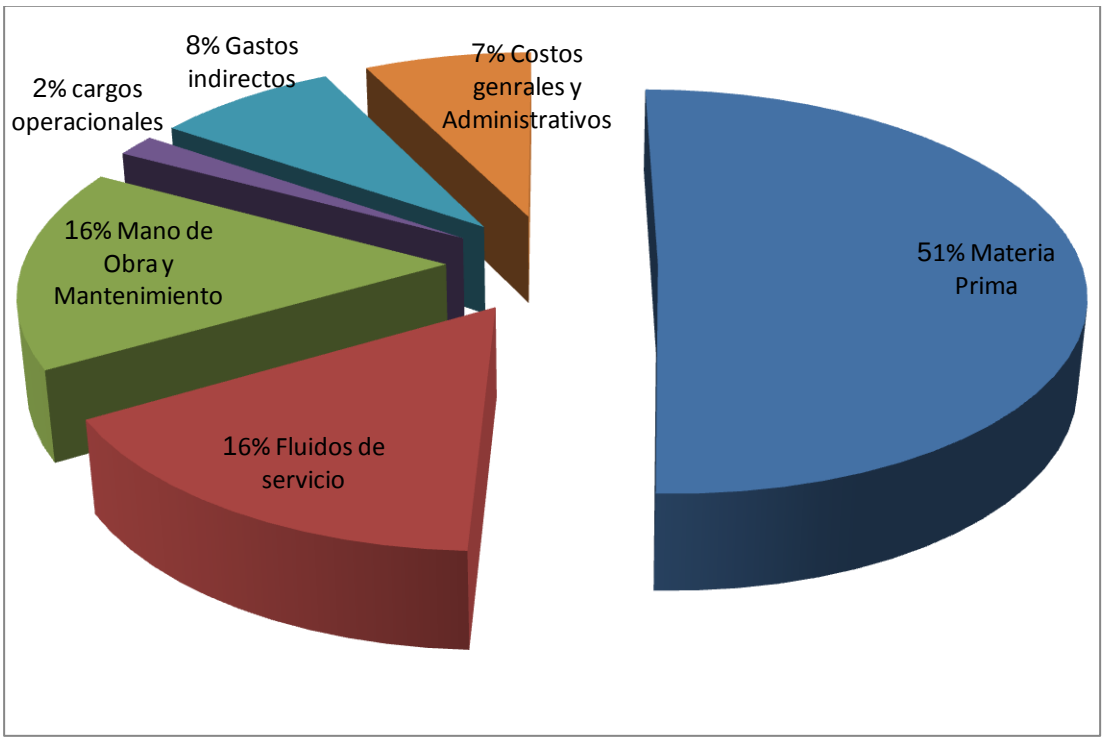

Figura 3-11: Distribución de costos para el cultivo de microalgas Chlorella Vulgaris

En la figura 3-12 se observa el análisis de impacto ambiental del cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris* sin incluir los productos en las corrientes de residuo. El PEI total mitigado en el proceso es favorable e igual a -0.55 PEI/Kg de productos.

Discusión: Desde la perspectiva del cultivo de microalgas, al caso la *Chlorella vulgaris* brinda un enorme panorama hacia la producción de biocombustibles y otros metabolitos. Su rendimiento de extracción de aceites y de pasta calculado en este escenario se aproxima enormemente al obtenido por muchos autores en otras publicaciones, como Chisti y colaboradores [1]. Es muy claro que el rendimiento hacia aceite de esta microalga es muy alto, pero además, su pasta de biomasa permite jugar con dos tipos de tecnología dada su composición rica en carbohidratos y proteínas: estas estructuras son la cogeneración del proceso, y la obtención de metabolitos de mayor valor agregado como bioetanol. El costo del aceite de *Chlorella vulgairs* asociado al cultivo **(USD 0.504/L)** resulta competidor comparado con otros aceites como el de Jatrofa **(USD 0.325/L)**, el de Palma **(USD 0.426/L)**, de cebo **(USD 0.186/L),** y los aceites usados **(USD 0.139/L).** Si bien es mas caro que los otros aceites comunes para la producción de

biodiesel, en promedio **0.532** veces mas costoso, dado su volumén de proudcción a un área de cultivo **32** veces menor que el Área necesaria de cultivo de Palma necesario para cubrir la demanda de aceite para biodiesel del país (ver Figura 3-12) lo hace extremadamente rentable y una opción tecnológica en el marco de la produccón de biocombustibles en Colombia.

Al intensificar el cultivo y crecimiento de biomasa, el precio del aceite se reduciría enomermemnte debido a la la super producción y las ventajas de estos microorganimos hablando metabolicamente debido a su capacidad fotosintética y duplicacíon de celulas en tiempos cortos de residencia a un área menor de cultivo. Si se analiza la influencia de los procesos de pretratamiento de la biomasa crecida en fotoreactor hasta la extracción de los metabolitos de ínteres, se puede observar el costo de la recolección, secado y extracción con solventes resulta ser **2.7 veces mayor** que el costo de producción de la biomasa cruda. Este hecho es consecuencia de la demanda energética del proceso, principalmente en el secado. Sin embargo, la integración energética debido al aprovechamiento enerético de las zonas de interenfriamiento del proceso solventa alrededor de 2/3 de la energía total, y si la energía producida en la biorefinería de cascarilla de arroz se alimenta y aprovecha en este escenario, los costos debido a la energía disminuirían enormente.

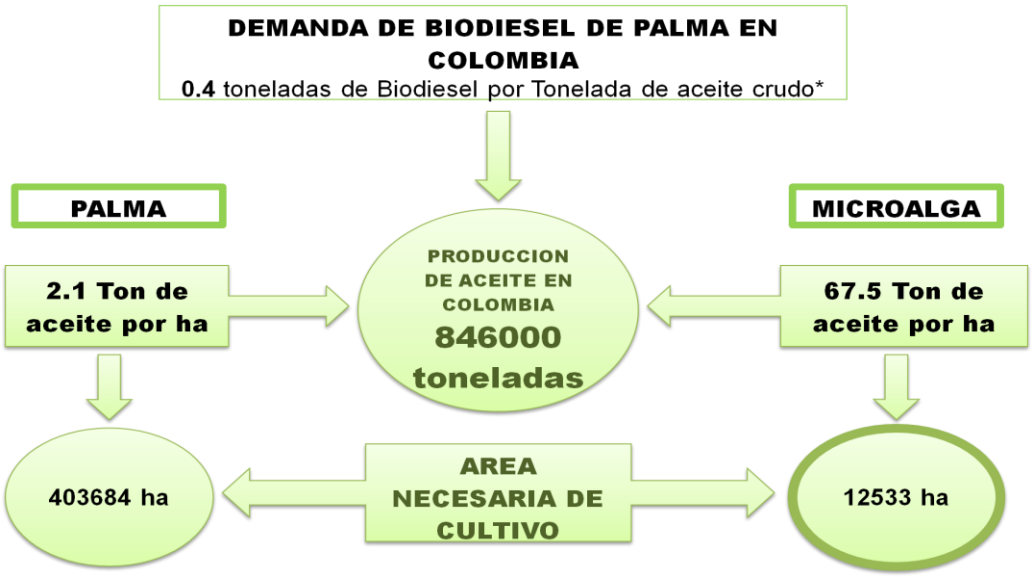

Figura 3-12: Ventajas del cultivo de microalga *Chlorella Vulgaris* a nivel agrario.*Fuente: Federación Nacional de Biocombustibles 2011

La Figura 3-11 demuestra que los costos de producción asociados al cultivo global de microalgas hasta la extracción de metabolitos, se ve intensamente afectada por el precio de las materias primas, contubruyendo con un 50% al costo total. Este hecho es debido a la cantidad de solvente usada y los nutrientes necesarios para el medio de cultivo y adapatción de la microalga. El sustrato en este escenario proviene de una corriente de residuos de gases de combustión, por lo cual su costo se limita al transporte. El anásilis de impacto ambiental del cultivo (ver Figura 3-13) demuestra una enorme mitigación de gases de efecto invernadero y formadores de smog **(PCOP)**, justificado por la transformación de una corriente de gases de combustión con una carga potencial negativa al ambiente en metabolitos de valor agregado e interés industrial al ser metabolizados por las microalgas. Sin embergo, el PEI/Kg de productos de salida hace un hincapie en las corrientes de residuo de CO_2 de desperdicio, y el caldo de cultivo residual, los cuales, si se vierten al ecosistema incrementarían en los alrededores el potencial de lluvia ácida y acidificación de suelos sumado al fenómeno de calentamiento global **(AP y GWP)** y posible daño en la salud humana y animal por envenenamiento **(HTPI y TTP).**

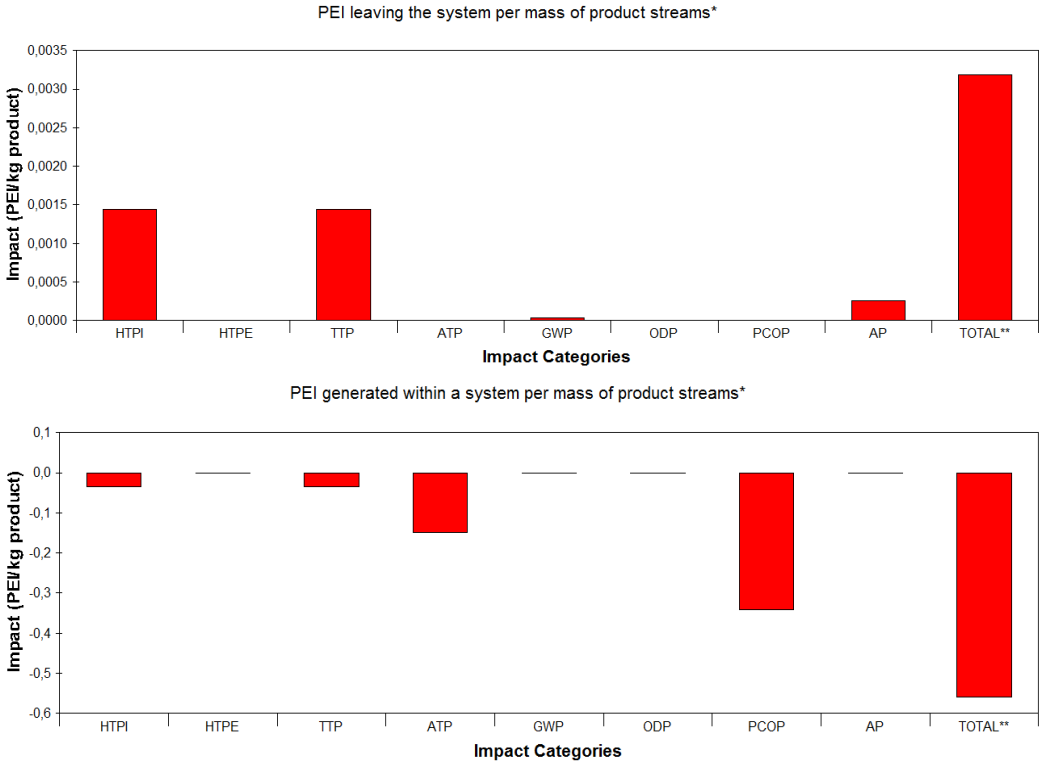

Figura 3-13: Análisis de impacto ambiental del cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris*

3.1.5 Diseño de un fotoreactor para el crecimiento celular de la microalga *Chlorella Vulgaris*

Se modeló y simuló un fotoreactor para el crecimiento de la microalga *Chlorella Vulgaris* bajo condiciones óptimas de luz y diseño. La simulación fue llevada a cabo en software comercial MATLAB R2008B usando un método de solución DAE (Differential and algebraic equations). Se encontró que la productividad óptima de cultivo es de 0.015 (células $((m^2\ s)^{-1})$) con concentraciones de biomasa de $450x10^6$ células por mL, una altura de columna de 2m y una relación de área de oscuridad a luz de 0.5.Se confirma la gran influencia de las zonas de luz y oscuridad sobre el crecimiento de microalgas y sobre el desempeño del fotoreactor para así conseguir una isla de crecimiento de células óptimas que defina de forma rápida las condiciones de diseño más favorables.

Modelación y simulación: Eilers y Peeters en 1988 propusieron el concepto de fábrica fotosintética (PSF) definida como la suma de los sistemas que atrapan la luz, centros de reacción y dispositivos relacionados, los cuales son activados por la energía de la luz produciendo un numero de fotoproductos [7]. En la Figura 3-14 se puede ver que el PSF está basado en tres estados de la microalga, uno de reposo (x_1) en el cual la microalga puede ser estimulada y transferida a otro estado activo por la captura de un fotón. El activo (x_2) que tiene dos opciones: obtener otro fotón y ser inhibido (daño fotosintético) o gastar la energía acumulada a aceptores para iniciar el proceso fotosintético y regresar al estado inicial. El estado de inhibición (x_3) incluye la saturación de luz, y puede recobrase fácilmente y regresar al estado de reposo. [190].

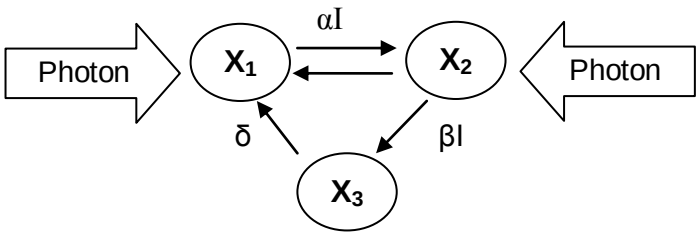

Figura 3-14: Modelo PSF

La velocidad de reacción es tomada del primer orden con respecto a la densidad del flujo de fotones (PSD) con constantes cinéticas asociadas α, β, γ, δ, κ. I es la intensidad de luz irradiada sobre el medio.

Wu y Merchuk [190] modificaron el modelo agregando un termino de mantenimiento celular (Me) para tener en cuenta el efecto de la reducción de la luz en el crecimiento de la biomasa, ya que en sus observaciones experimentales encontraron un descenso bajo estas condiciones [190]. La cinética del crecimiento del modelo PSF se describe en las ecuaciones (3.1-3.4):

$$\frac{dx_1}{dt} = -\propto Ix_1 + \gamma x_2 + \delta(1 - x_1 - x_2) \qquad (3.1)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \propto Ix_1 - \gamma x_2 - \beta I x_2 \qquad (3.2)$$

$$\mu = k\gamma x_2 - Me \qquad (3.3)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \qquad (3.4)$$

Donde µ es la tasa especifica de crecimiento de la microalga y X es la concentración de biomasa en células mL^{-1}

En la implementación del modelo PSF a un fotoreactor como describe la Figura 3-15, se debe tener en cuenta la dinámica de fluidos y el efecto de la trayectoria de luz en las células de las microalgas.

El flujo de fluidos en el fotoreactor es simple e igual al de una columna de burbujeo. Sin embargo, el proceso fotosintético depende de la geometría. La zona de luz dominante por iluminación o PSD, y la zona oscura donde la iluminación es escasa o inexistente, depende de la posición radial. En el área traslucida se considera una iluminación homogénea. El tiempo de residencia en cada zona, luz, oscuridad, y translucida es calculado por las ecuación (3.5)-(3.7)

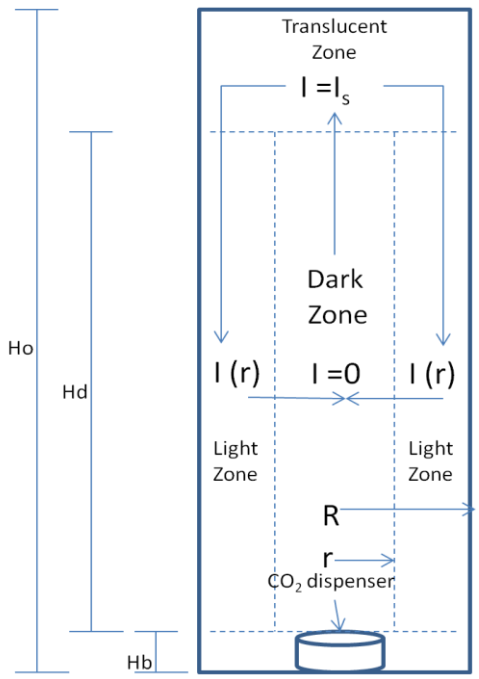

Figura 3-15: Diagrama esquemático del fotoreactor diseñado

$$t_{TZ} = \frac{H_s A(1-\emptyset)}{Q_L} \qquad (3.5)$$

$$t_{LZ} = \frac{H_d + H_b}{J_{LZ}} \qquad (3.6)$$

$$t_{DZ} = \frac{H_d + H_b}{J_{DZ}} \qquad (3.7)$$

Donde

$$H_S = H_0(1+\emptyset) - H_d - H_b \qquad (3.8)$$

$$Q_L = J_{LZ}A_{LZ} = J_{DZ}A_{DZ}(1-\emptyset) \qquad (3.9)$$

$$J_{DZ} = \frac{V_{DZ}}{(1-\emptyset)} \qquad (3.10)$$

t_{LZ}, t_{DZ}, t_{TZ} son los tiempos de residencia para la zona de luz, la zona oscura y la zona translúcida respectivamente. H_0, H_d, H_b, y H_s son la altura total del fotoreactor, la zona de luz, el dispensador del CO_2 y el bulk líquido (zona traslucida) respectivamente.

La velocidad de circulación de liquido (V_{DZ}) y la retención de gas (Φ) son calculadas por las ecuaciones (3.11)-(3.12)

$$\boldsymbol{V_{DZ} = 0.66 J_G^{0.33} \left(\frac{A_{LZ}}{A_{DZ}}\right)^{0.78}} \qquad (\mathbf{3.11})$$

$$\boldsymbol{\emptyset = 0.465 J_G^{0.65} \left(1 + \left(\frac{A_{LZ}}{A_{DZ}}\right)\right)^{-1.06} \eta^{-0.103}} \quad (\mathbf{3.12})$$

A, A_{LZ}, A_{DZ} son el área total, el área de la zona de luz y el área de la zona oscura respectivamente. η es la viscosidad aparente.

Ya que el fotoreactor es iluminando externamente, en la oscuridad la iluminación es imperceptible y I_{DZ} = 0. Esto es verdad por la alta densidad óptica del cultivo de microalgas en la zona de luz. En la zona traslucida, se integra la ley de Lambert para obtener un valor promedio de PSD por su uniformidad y mezcla perfecta:

$$\boldsymbol{I_{TZ=} \frac{2\left(\left(\frac{R}{P} - \frac{1}{P^2}\right) I_0 + \left(\frac{1}{P^2}\right) I_0 e^{PR}\right)}{R^2}} \qquad (\mathbf{3.13})$$

Donde P es el coeficiente de extinción $\boldsymbol{P = k_x X + k_w}$ $(\mathbf{3.14})$

En la zona de luz, las células de microalga presentan un PSD que es una función de la posición radial z. la ecuación (15) muestra el supuesto en la ley de Lamberth simplificada:

$$\boldsymbol{I_{LZ} = I_0 e^{Pz}} \qquad (\mathbf{3.15})$$

Donde Io es la iluminación en la superficie

Otro factor importante es el efecto del esfuerzo cortante por la interacción del flujo del fluido a las células que puede causar un descenso en la tasa de crecimiento celular, y en casos extremos la destrucción de la celular. Merchuk incorporo al modelo del mantenimiento celular este efecto de acuerdo a las ecuaciones (3.16) y (3.17), donde, si el esfuerzo de corte es crítico, el término de mantenimiento (Me) incrementa exponencialmente resultando en una baja tasa de crecimiento

$$\boldsymbol{Me = \overline{M_e} e^{k_m(\tau - \tau c)} \qquad \tau \geq \tau c} \qquad (\mathbf{3.16})$$

$$\boldsymbol{Me = \overline{M_e} \qquad \tau < \tau c} \qquad (\mathbf{3.17})$$

Donde τ es el esfuerzo de corte y τc es el esfuerzo de corte critico.

$$\boldsymbol{\tau = \eta \dot{\gamma}} \qquad (\mathbf{3.18})$$

$$\boldsymbol{\dot{\gamma} = \gamma' \left(\frac{V_{DZ} \emptyset}{Q_G} \right)} \qquad (\mathbf{3.19})$$

$$\boldsymbol{\gamma' = \left(\frac{p_1 J_G \ln\left(\frac{p_1}{p_2}\right)}{a_b {H_d}^2 \kappa} \right)^{\frac{1}{n}}} \qquad (\mathbf{3.20})$$

$$\boldsymbol{a_b = 4.6510^{-2} \left(\frac{J_G}{\kappa} \right)^{0.51}} \qquad (\mathbf{3.21})$$

Donde la presión es en Pa, K es el índice de consistencia de flujo, a_b es el área superficial, n es el índice de flujo, Q_G es el flujo volumétrico de gases y J_G y J_L son la velocidad especifica de gas y de líquido respectivamente

El modelo es resuelto para cada zona en el fotoreactor para la integración de las ecuaciones (1)-(4) entre t=0 hasta t= t_{iZ} donde t_{iZ} es el tiempo de residencia para la zona i (i=LZ,DZ,TZ) para cada ciclo de circulación de 10 s. La solución del modelo en estado cuasi-estable es propuesto por (Wu y Merchuk 2004).

Los parámetros para el modelado de la microalga Chlorella Vulgaris de acuerdo a [7] se enlistan en la Tabla 1-1.

La optimización del fotoreactor es evaluada para maximizar la productividad del crecimiento celular (Ec. 3.22) como una función de las variables de diseño H_d y la (A_{DZ} A_{LZ}^{-1}) tasa.

$$\boldsymbol{Pg} = \frac{(\boldsymbol{2R})^2 \boldsymbol{H_d}}{(\boldsymbol{2R} + \boldsymbol{L})} \frac{(\boldsymbol{x_f} - \boldsymbol{x_0})}{\Delta \boldsymbol{T}} \qquad (\boldsymbol{3.22})$$

Donde x_f es la concentración máxima de biomasa, Xo es la concentración inicial de biomasa ($8*10^6$ células ml^{-1}), L es la suma del diámetro adicional requerido para el paso de luz, asumido 0.9 m, ΔT es el tiempo de cultivo de la microalga.

Tabla 3-9: Parámetros de crecimiento de la microalga Chlorella Vulgaris [7]

Parámetro	Valor*
A	0.001935 m^2 $(\mu E)^{-1}$
B	$5.7848*10^{-7}$ m^2 $(\mu E)^{-1}$
Γ	0.14521788 s^{-1}
Δ	0.0004796 s^{-1}
K	$3.6467*10^{-4}$ s^{-1}
M	$1.641*10^{-5}$ s^{-1}
Io	1272 μE $(m^2 s)^{-1}$

*. Valores tomados del trabajo de Marshall y cuyo grado de precisión influencia enormemente la estabilidad de cálculo del modelo propuesto.

La simulación fue llevada a cabo en el software comercial MatLab R2008 b usando como método de solución una mezcla de ecuaciones algebraicas y ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden (DAE) aplicando la metodología de diferencias finitas en un Pc de 3 GB de memoria RAM y un procesador Intel Core I3

Resultados: Los resultados obtenidos realizando un análisis de sensibilidad al modelo de crecimiento de la microalga *Chlorella Vulgaris* como una función de la maximización de la productividad de crecimiento (Figura 3-16) alcanzando los valores óptimos de 0.015 (10^6 células $(m^2 s)^{-1}$) con concentración de biomasa de $450*10^6$ células ml^{-1} (Figura 3-17) una altura de columna de 2 m y una relación de área de zona oscura a zona de luz de

0,5. La Figura 3-18 muestra el perfil de crecimiento a las condiciones óptimas con un tiempo de cultivo de alrededor de 1,1 h.

Discusión: Es claro que la Figura 3-16 y Figura 3-17 están acopladas, ya que el crecimiento de la productividad es una función de la concentración de biomasa a la salida (Ec. 3.22). Como es de esperarse, el crecimiento de la microalga es fuertemente influenciado por la intensidad de la luz del fotoreactor, haciendo obvio que a una mayor relación de zona de oscuridad a zonda de luz desciende el crecimiento celular. A su vez en cuanto mayor sea la atura de la columna (vaso) del fotoreactor aumenta el crecimiento ya que aumenta todas las áreas y la relación optima de oscuridad a luz, el crecimiento de biomasa a lo largo de la trayectoria de la luz también se incrementa (ver Figura 3-16 y Figura 3-17). La concentración de la producción de biomasa y las condiciones de diseño optimas encontradas, tienen una fuerte influencia en el tiempo de cultivo, que tiende a aumentar. Esto se explica fácilmente debido a la alta densidad celular obtenida (Figura 3-18) a partir de la cual ocurre el daño fotosintético y el decrecimiento de la biomasa.

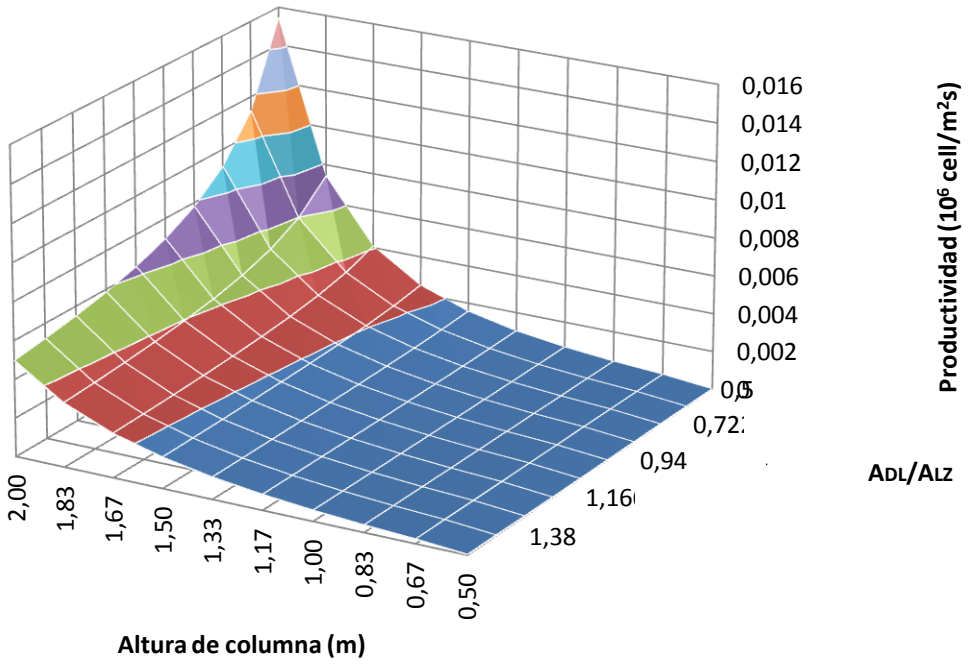

Figura 3-16: Análisis de sensibilidad de la productividad de crecimiento de microalga vs altura de columna vs relación ($A_{DZ}\,A_{LZ}^{-1}$)

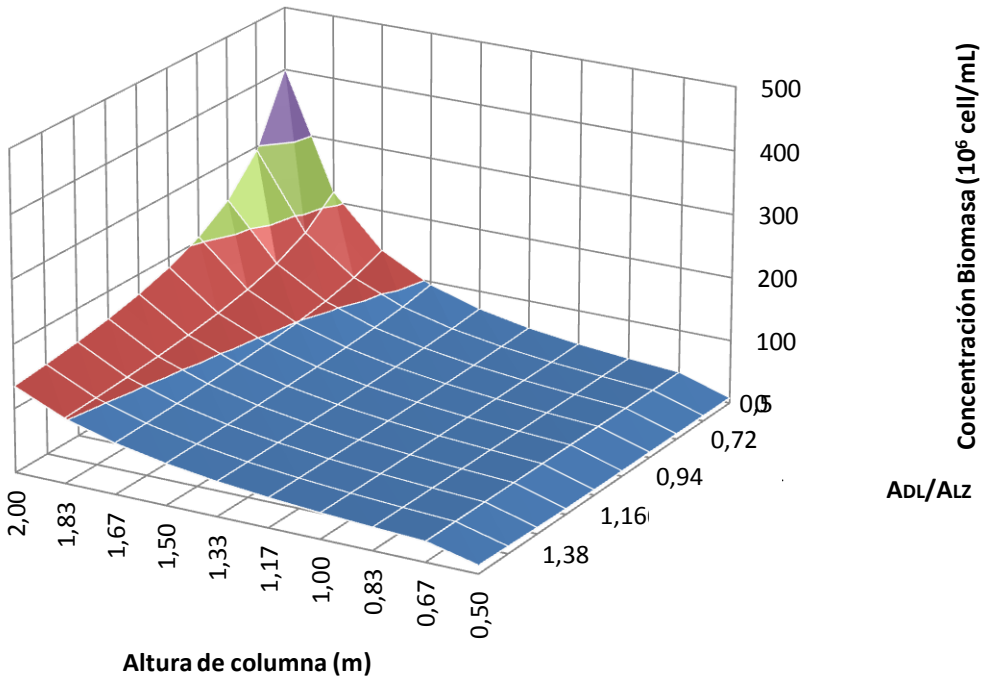

Figura 3-17: Análisis de sensibilidad de la máxima concentración de biomasa de microalga vs Altura de columna vs relación ($A_{DZ} A_{LZ}^{-1}$)

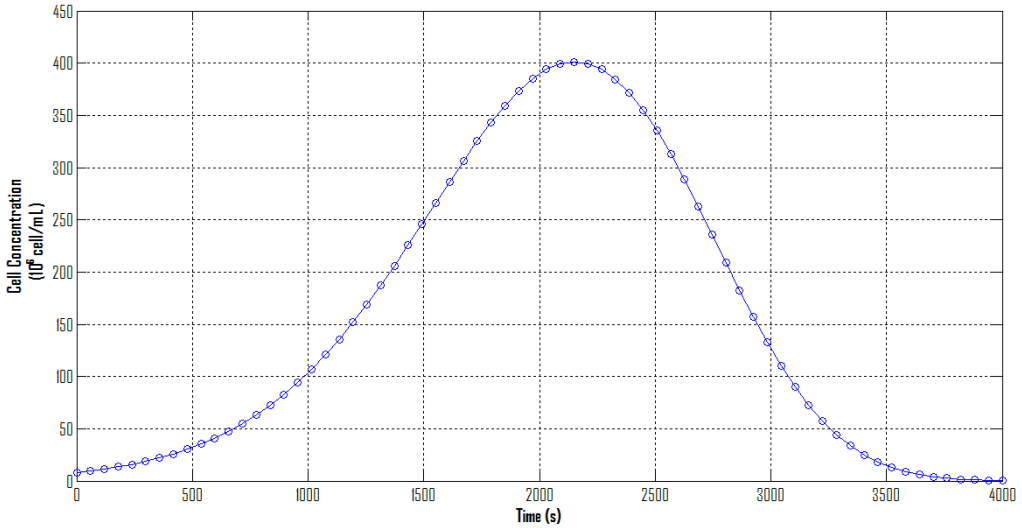

Figura 3-18: Perfil de concentración de biomasa de microalga

De acuerdo a Merchuk y Wu [191], es posible establecer una isla de crecimiento efectivo y optimo de la microalga. Un análisis de sensibilidad de la productividad se puede abstraer de este concepto y aplicarlo al caso de crecimiento de la *Chlorella Vulgaris*,

definiendo áreas optimas de crecimiento para la relación oscuridad y luz a la altura del fotoreactor en la Figura 3-19. La visualización del caso se vuelve más creativo ya que se puede localizar la isla, la viabilidad optima del cultivo de microalgas el diseño del fotoreactor bajo las mismas condiciones referidas en este trabajo.

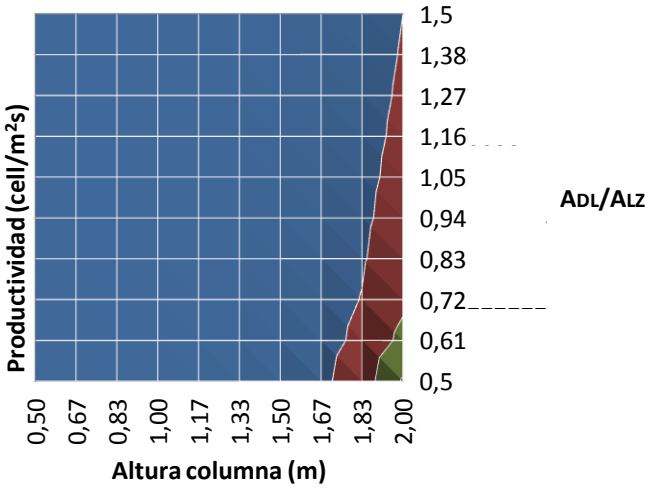

Figura 3-19: Isla de crecimiento óptimo para *Chlorella Vulgaris*

3.1.6 Producción de biodiesel a partir de aceite de microalga *Chlorella Vulgaris*: Comparación con otras materias primas del sector productivo Colombiano.

Diferentes metodologías de ingeniería de procesos basadas en diseño conceptual y simulación de procesos con ASPEN PLUS, algoritmo de reducción de residuos se implementaron para evaluar técnica, económica, y ambientalmente la producción de biodiesel de microalga *Chlorella Vulgaris* y se comparó con la producción e biodiesel a partir de palma, jatrofa, cebo y aceites de cocina usados, usando tres diferentes configuraciones desde la industria, como procesos con catálisis ácida y básica y cogeneración en el contexto colombiano. Se encontró como las productividades para los procesos catalizados con NaOH son comparativamente superiores (1.007-1.014 Kg de biodiesel por kg de de aceite crudo) que los catalizados por H_2SO_4 (0.845-0.949 kg de biodiesel por kg de aceite crudo). Los costos de producción para los procesos con

catálisis básica (USD 0.408-0.505 por litro) fueron más altos que las catálisis con ácido (USD 0.219-0.257 por litro). El potencial de impacto ambiental (PEI) generado por catálisis básica oscila entre 0.078 y -0.033 PEI/kg de productos mientras que en catálisis ácida entre -0.031 y -0.025 PEI/kg. Los resultados obtenidos evidencian el gran potencial de la producción de biodiesel de microalga siendo competente con las materias primas tradicionales para su fabricación.

Materias primas para la producción de biodiesel: En este escenario, 5 materias primas para la producción de biodiesel, son analizadas con potencial para ser usadas en países tropicales y subtropicales. I) **Aceite de palma**, es una de las mayores fuentes de aceites comestibles en el mundo, se extendió por zonas tropicales, entre los principales productores están Malasia, Indonesia y Colombia con el 83% de la producción mundial [192]. Es un cultivo de alto rendimiento que requiere pequeñas aéreas para ser cultivado. ii) **Jatrofa Curcas**, cultivo nativo americano, en un pequeño árbol perteneciente a la familia de *Euphorbiaceae.* Este cultivo es una planta altamente resistente capaz de sobrevivir en condiciones hostiles y en áreas con altas o bajas lluvias, siendo cultivadas fácilmente con poco esfuerzo de mantenimiento [193]. iii) **Microalgas,** es una materia prima prometedora, debido a su habilidad para acumular lípidos y su rendimiento fotosintético. Aquellas usadas en la producción de biodiesel se componen en un 40% de su masa total por ácidos grasos, entre sus especies representativas están: *Chlorella, Spirulina máxima y Nannochloropsis sp.* Son de crecimiento rápido en hábitats acuáticos, bajo condiciones autotróficas y heterotróficas [194]. iv) **Aceite usado,** incluye residuos de aceites de freír, grasas amarillas y marrón, que se obtienen de los restaurantes, hoteles e industrias; su contenido libre de ácidos grasos está entre 10 y 25%, como resultado del proceso de fritado donde el calentamiento es en presencia de aire y luz incrementa la viscosidad y el calor especifico, también cambia la tensión superficial, color y la tendencia a la formación de grasa. Estas características hacen necesaria una etapa de pretratamiento antes de la conversión a biodiesel [195]. Finalmente, v) **Aceite de cebo,** es un término referido a aquellas grasas y aceites obtenidos en los mataderos de animales. El consumo de cebo por los humanos es bajo debido a sus efectos sobre la salud, encontrando su uso principal en la industria del jabón. Sin embargo, cuando el mercado está sobrecargado, este aceite es incinerado o depositado en rellenos sanitarios [144]. Por esto su uso como materia prima para biodiesel, es una alternativa atractiva debido a su fácil disponibilidad e historial de precios bajos.

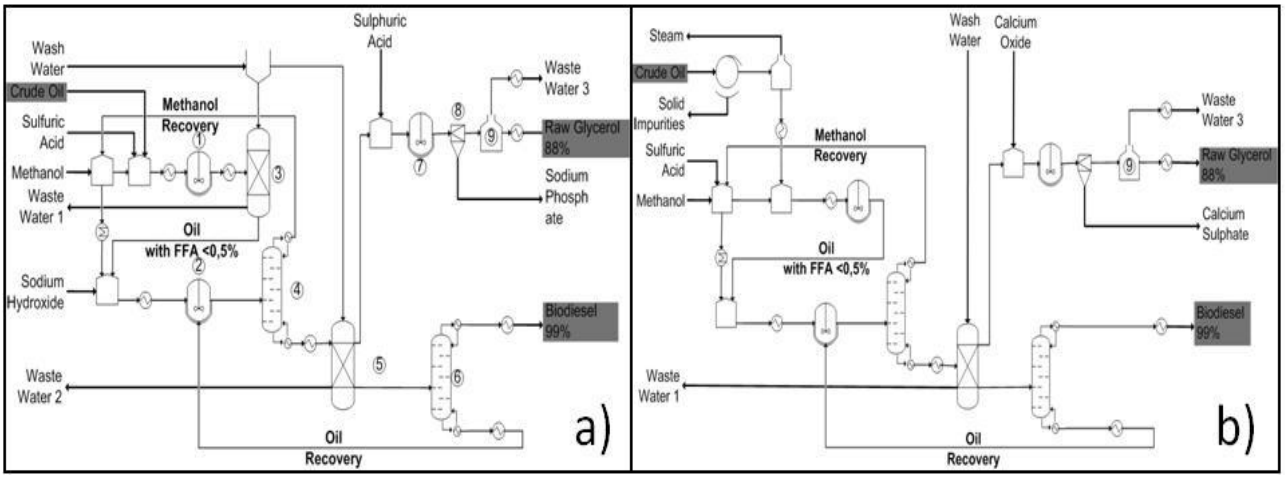

Figura 3-20: Diagrama de flujo de proceso para la producción de biodiesel usando **(a)** Catálisis Ácida y **(b)** Catálisis básica

Tecnologías para la producción de Biodiesel: La producción de biodiesel puede ser descrita, de manera general, por tres etapas principales secuenciales: i) Pretratamiento, donde elementos indeseados que contiene el aceite crudo son retirados. Partículas, material coloide, pigmentos, extracción de residuos y otras impurezas pueden ser removidas usando filtración. Cuando el contenido de agua (>0,06%) y contenido de ácidos grasos libres (FFA) (>4%) se puede inducir una reacción de saponificación, generándose un jabón en gel en lugar de biodiesel. Para evitar esto es necesario secar el aceite y eliminar los ácidos grasos libres, usando: Preesterificación o neutralización. ii) Reacción, en esta etapa, el aceite sufre una reacción de transesterificación. El metanol es el alcohol más usado por su bajo costo y propiedades físicas y químicas. Los catalizadores principales empleados en el proceso de transesterificación son: ácidos (sulfúrico, fosfórico) o bases (hidróxido de sodio o potasio) [8]. iii) Separación y purificación es empleado para producir biodiesel con altos requerimientos de calidad. La purificación de biodiesel es realizada por dos rutas principales: 1) separando primero esteres y glicerina, luego recuperando el alcohol no convertido o 2) usando destilación al vacio para separar el alcohol no convertido, usando un decantador para separar la glicerina y el biodiesel [196].El biodiesel obtenido es entonces purificado, removiendo el exceso de alcohol, catalizador, sales de neutralización y posibles jabones formados. La selección de la tecnología para la producción de biodiesel determina las variables principales del proceso, como son: el tiempo de reacción, la fase, catalizador, así como el consumo de energía (ver Figura 3-20**Figura 3-20**)

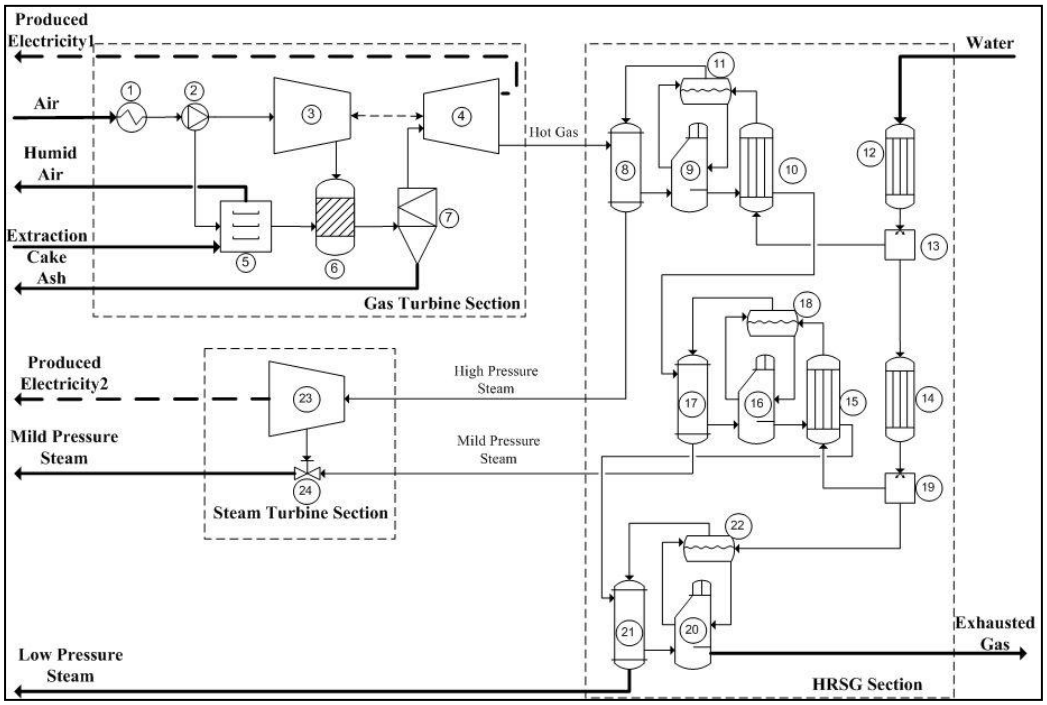

Figura 3-21: Diagrama de flujo de proceso de un sistema de cogeneración basado en los residuos de pasta extraída.

Las plantas de cogeneración integradas a las plantas de producción de biodiesel usualmente emplean las tortas extraídas y otros residuos de biomasa como combustible en una configuración llamada cogeneración por combustión directa de biomasa. Combinar la producción de energía mecánica y térmica tiene un gran ahorro en los costos y la energía. Entre las tecnologías para cogeneración por combustión directa de biomasa, las turbinas de gas de ciclo combinado (CCGT), es considerada como la más eficiente energéticamente. La configuración CCGT está compuesta por: Turbina de gas, generador de vapor por recuperación de calor (HSRG) y turbina de vapor (Figura 3-21) [197]

La simulación de la producción de biodiesel y la cogeneración de calor y energía fueron realizadas en Aspen Plus 2006.5 (Aspen Technologies Inc., USA). Este esquema permite resolver los balances de masa y energía, así como, las estimaciones de ingeniería básicas para el dimensionamiento y consumo de energía de los equipos. Las materias primas (Palma, Jatrofa, microalga *Chlorella Vulgaris*, cebo, y aceites usados) para la producción de biodiesel, fueron modeladas como una especie de pseudocomponentes, creados para representar triglicéridos y metil esteres, de acuerdo a la metodología de Chang y Liu [198]. Por el contrario, la torta de aceite de palma, la torta de aceite de

jatrofa y la pasta de microalga fueron introducidas a la base de datos del simulador como componentes no convencionales de acuerdo a su análisis elemental e inmediato. Propiedades fisicoquímicas de los pseudocomponentes, fueron estimadas usando el método de Marrero y Gani [177]. Como métodos base se uso UNIFAC Dortmund para la fase liquida, Soave Redlich Kwong con la modificación de Bosto Mathias para la fase de vapor, las tablas de vapor de agua calculadas con NBS. El modelo cinético para catálisis acida y básica, empleado en este trabajo, fue el reportado por Granjo et al. [199], con expresiones de primer y segundo orden, respectivamente. El proceso de biodiesel simulado uso la misma tasa de flujo de entrada de 1000 Kg/h, para hacer una comparación entre rendimientos de todos los procesos. Adicionalmente, de estos valores, fue calculado una tasa flujo de residuos para la torta de palma de aceite, torta de aceite de jatrofa y pasta de microalgas; usando este como entrada para la cogeneración por combustión directa de biomasa. El análisis económico fue realizado usando el paquete Aspen Process Economic Analyzer (Aspen Technology, Inc, USA), para calcular un costo global en dólares US por litro de biodiesel producido con la materia prima seleccionada. Este análisis fue realizado usando la información de diseño proporcionada por Aspen Plus, bajo las condiciones económicas de Colombia (tasa de interés anual de 17% e impuestos del 33%). Método de depreciación en lineal recta, se considero, un periodo de análisis de 12 años. Para los precios de las materias primas fueron empleados los reportados por ICIS, mientras que las cargas operativas como costo de un operador y de un superviso fueron definidos para ambos países en 2,14 USD/h y 4.29 USD/h, respectivamente. Los costos de electricidad, agua potable, vapor de alta y baja presión son 0,0304 USD/kWh, 1,25 USD/m^3, 8,18 USD/ton. El impacto ambiental fue evaluado con WAR, Algoritmo de Reducción de Residuo (EPA,USA), para estimar el potencial de impacto ambiental (PEI) generado en el proceso de producción de biodiesel. Considerando ocho categorías de impacto: Potencial de toxicidad por ingestión humana (HTPI). Potencial de toxicidad humana por exposición dérmica e inhalación (HTPE), potencial de toxicidad terrestre (TTP), potencial de toxicidad acuática (ATP), potencial de calentamiento global (GWP), potencial de agotamiento de la capa de ozono (ODP),potencial de oxidación fotoquímica (PCOP) y potencial de acidificación (AP). El flujo molar de cada componente en las corrientes de proceso es multiplicado por su potencial químico, determinando su contribución a las categorías de potencial de impacto ambiental [200]. Para comparar los perfiles ambientales de todo el proceso el PEI total fue determinado por la suma de todas las categorías (ocho) de impacto como sigue:

$\sum_{i=1}^{n} \propto_i \varphi_i$ donde α_i es el factor de ponderación por categoría de impacto ambiental i. En este trabajo todos los factores de ponderación se establecieron iguales a 1.

Resultados: En la simulación de la producción de biodiesel para proceso catalizado por acido y base usando palma, jatrofa, microalgas, cebo y aceite de cocina usado como materia prima (verTabla 3-10), se encontró como las productividades para los procesos catalizados con NaOH son comparativamente mayores (1,007-1,0014 Kg biodiesel/ kg de petróleo), que aquellos catalizados con H_2SO_4 (0.848-0.949 Kg biodiesel por Kg de aceite crudo). Por otro lado, el consumo de metanol así como el consumo global de energía (calentamiento y electricidad) es mayor para los procesos con catálisis acida, con requerimientos 1.579-1.772 Kg metanol por kg aceite crudo y calentamiento de 53.389-69.112 MW respectivamente. Acerca de los residuos del proceso, el catalizador acido también tiene mayores tasa de generación de aguas de residuales (1.863-2.163 kg de agua/ kg de aceite crudo).

Tabla 3-10: Resultados de la simulación de la producción de Biodiesel usando catalizadores acido o básico

	Catalizador Básico			**Catalizador ácido**	
	Aceite de Palma	**Aceite de Jatrofa**	**Aceite de microalga**	**Aceite de sebo**	**Aceite de cocina usado**
Materiales (kg/h)					
Aceite crudo	1000.00	1000.00	1000.000	1000.00	1000.00
Contenido de FFA (% wt)	6%	4%	4%	15%	10%
Contenido de agua(% wt)	0%	0%	0%	8%	12%
Metanol	160.21	214.75	207.77	1579.07	1772.44
NaOH	9.40	9.60	9.29	-	-
Agua	1400.00	1400.00	1400.00	1250.00	1400.00
H_2SO_4	21.00	21.45	20.75	35.00	41.20
CaO	-	-	-	30.00	29.60
Productos (kg/h)					
Biodiesel @>99% wt	1007.46	1009.69	1014.62	949.85	847.63
Glicerol @>88% wt	113.05	117.34	127.33	81.95	82.07
Agua de residuo	1010.95	942.77	1062.20	2163.03	1836.84
$CaSO_4$	-	-	-	104.51	95.27
Na_2SO_4	10.64	17.03	17.03	-	-

Los resultados de la cogeneración por combustión directa de biomasa usando torta de aceite de palma, torta de aceite de jatrofa y pasta de microalgas como combustibles (ver Tabla 3-11) revela como producción de energía de calentamiento por la torta de jatrofa

(31,34 MW) es mayor que la producida con pasta de microalgas (33,82 MW) y torta de palma de aceite (20,61MW). En consecuencia, solo las necesidades de calentamiento para la producción de biodiesel de jatrofa (26,59MW) se encuentran plenamente satisfechos. Biodiesel de aceite de palma y aceite de microalga cumplen solamente con el 68,13% y 74,15 % de los requerimientos de calentamiento respectivamente. Lo que se refiere a la electricidad, todos los procesos de cogeneración cubren el 100% de los requerimientos de la planta de biodiesel, con un excedente para ser vendido. Sin embargo, entre los tres residuos considerados, fue la pasta de microalgas la que cogenero mas electricidad (8,34MW) que la torta de aceite de jatrofa (7,06MW) y pastel de aceite de palma (4,88 MW).

Los resultados de la evolución económica de la producción de biodiesel en el contexto colombiano se presentan en la

Tabla 3-12. Como destacan los resultados, el costo de materia prima para el proceso catalizado por bases (0.325-0.504 USD/L) fue mayor a aquellos catalizados por ácidos (0.139-0.186 USD/L). Por otra parte, las utilidades por los procesos catalizados por ácidos (0.044-0.052USD/L) fueron mayores que los catalizados por bases (0.021-0.022 USD/L).

Tabla 3-11: Resultados de cogeneración para la extracción de residuos para el sistema de cogeneración por combustión directa de biomasa.

	Torta de aceite de Jatrofa	**Torta de aceite de palma**	**Pasta de aceite de microalgas**
Residuos disponibles[kg/h]	3092	2304	3964
Valor calorifico[MJ/kg]	15.77	12.32	14.21
Calor Total Cogenerado [MW]	31.34	20.61	33.83
Electricidad Total Cogenerada [MW]	7.66	4.88	8.34

El costo restante de ambos procesos es similar. Como resultado, los costos de producción para el proceso catalizado por bases (USD 0,408-0,585 USD/L) fueron mayores que aquellos catalizados por ácidos (0.219-0.257 USD/L). Sin embargo, considerando el potencial de ingresos por la venta de la electricidad generada, se puede mostrar como el costo total de producción de biodiesel por jatrofa, palma y microalgas fue reducido en 0.157 UDS/L, 0.337 USD/L y 0.585 USD/L respectivamente.

La evaluación ambiental de los procesos de producción de biodiesel por catálisis básica muestra un PEI/Kg de producto entre 0.037 y $5.518*10^{-2}$, mientras que los de catálisis ácida entre 0.139 y 0.317 para las emisiones de salida. Si analizamos la influencia de la materia prima en la generación de emisiones. Se muestra que los procesos en catálisis básica está entre -0.078 y -0.033 PEI por Kg de producto mientras que los catalizados por ácidos de -0.031 y 0.025 (ver Figura 3-22).

Discusión: En este trabajo, los resultados obtenidos revelan como con las 5 materias primas seleccionadas es posible obtener biodiesel de alta calidad (>99 %wt); además, glicerol crudo (88%wt). Entre los resultados para la simulación del proceso químico, puede mostrarse como el proceso catalizado por bases tiene mayores rendimientos de biodiesel (74-78%), que catalizados con acido (54-63%), con consecuente reducción en el biodiesel total producido. Estos resultados son menores comparados con los valores de simulaciones de biodiesel 90-95%, reportados en la literatura [201]. Este hecho puede explicarse por la baja calidad de las materias primas consideradas, especialmente cebo y aceite de cocina usado, donde el contenido de ácidos grasos y la presencia de impurezas es alto, el cual, a pesar de incrementar la calidad de la simulación, reduce la cantidad inicial de reactivo disponible para la reacción de transesterificación, reduciendo también el biodiesel producido.

Tabla 3-12: Resultados de la Evaluación económica para la producción de biodiesel usando catalizador básico

	Aceite de Jatrofa	**Aceite de Palma**	**Aceite de Microalga**	**Aceites usados**	**Aceite de sebo**
	USD/L	USD/L	USD/L	USD/L	USD/L
Costo de materias primas	0.325	0.426	0.504	0.139	0.186
Costo Total Utilidades	0.022	0.021	0.022	0.052	0.044
Labor Operativa	0.008	0.008	0.008	0.009	0.008
Mantenimiento	0.005	0.004	0.005	0.002	0.002
Cargas Operativas	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Gastos generales	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005
Costos generales y administrativos	0.039	0.037	0.038	0.008	0.010
Costo subtotal	0.41	0.51	0.585	0.22	0.26
Crédito por venta de electricidad	- 0.25	- 0.17	- 0.28	0.000	0.000
Costo total incluyendo Cogeneración	0.16	0.34	0.31	0.22	0.26

Respecto a los resultados de cogeneración, estos dan una ventaja al proceso con catalizador acido debido a la posibilidad de emplear la extracción de residuos para general calor y energía. El mayor potencial de calentamiento fue el relacionado a la torta de aceite de jatrofa, mientras que la mayor potencial de energía fue el de la pasta de microalgas. Este resultado puede ser parcialmente explicado por el alto valor calorífico y el flujo disponible de estos residuos, que incrementan el potencial para generar vapor y en consecuencia producir calor y potencia (ver Tabla 3-11). Los resultados de la torta de jatrofa fueron los mejores, debido a su capacidad para satisfacer las necesidades de calefacción de la planta de biodiesel, generando también una importante cantidad de electricidad capaz de vender a la red central.

La evaluación económica del proceso de producción de biodiesel, sin cogeneración, muestra como el costo de producción usando catálisis básica, inicialmente fueron mayores que la catálisis acida, a pesar del alto consumo de metanol al final. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura donde el rango de costo de producción de biodiesel está entre (0,30-0,6 USD/L) [1].

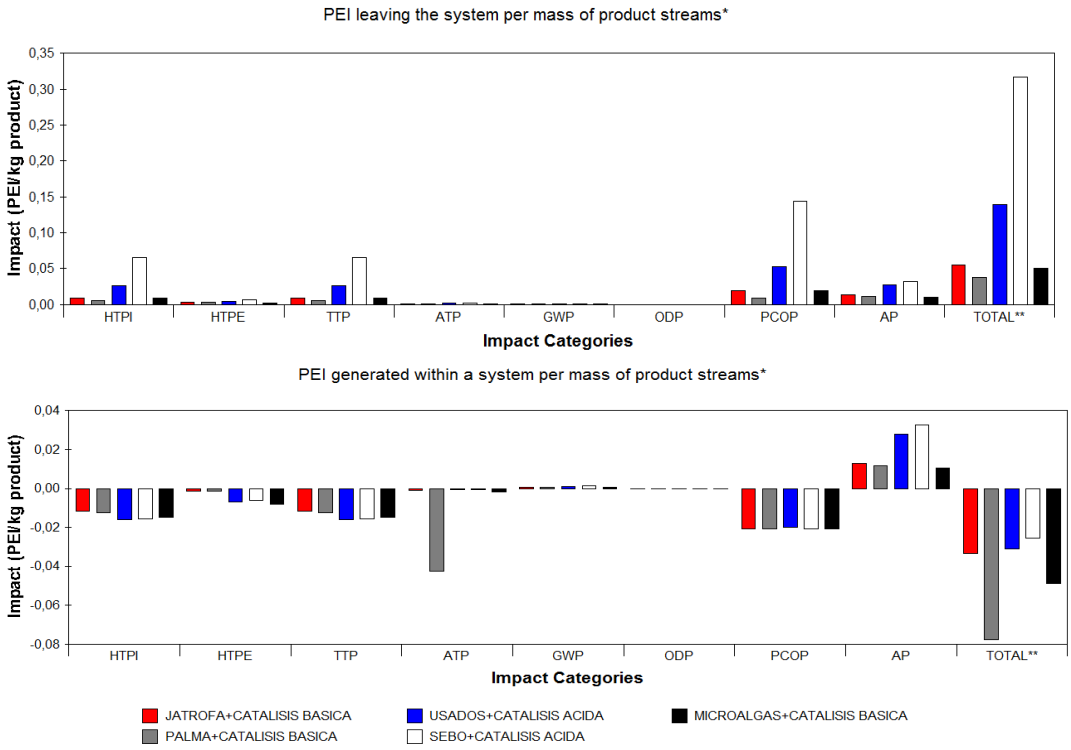

Figura 3-22: Análisis de impacto ambiental para la producción de biodiesel a partir de diferentes materias primas

El componente principal del análisis de costos de producción fue el precio de la materia prima, que mayor para aceites vegetales y de microalga (jatrofa, palma) que por aceites residuales (cebo y residuos de cocina), explicando sus bajos costos de producción. Sin embargo, cuando se incluye el esquema de cogeneración para los proceso basados en aceites vegetales, el cual puede emplear los residuos extraídos como combustible para el esquema de combustión directa de biomasa, el costo de producción total para la catálisis básica se reduce (ver Tabla 3-12).

El análisis de los resultados ambientales, revelados por el algoritmo WAR, como a pesar que todos los procesos tienen un PEI positivo, pueden generar lluvia acida por su potencial de acidificación positivo producido por el acido sulfúrico. En este sentido, el proceso catalizado por acido tiene mayores corrientes de desechos contaminante que la catálisis básica. Particularmente, las emisiones de residuos del proceso con aceite de cocina usado, tiene un PEI más positivo entre todos los procesos simulados. Este efecto puede ser explicado por las sustancias contenidas en estos residuos de proceso, los cuales tienen un alto grado de potencial PCOP influenciado por la catálisis acida, incrementando los valores totales. Por otra parte, los aceites de palma y jatrofa tienen comparativamente un PEI menor, revelándolos como materias primas amigables con el medioambiente, porque, estas son convertidas en un producto de valor agregado en un proceso más limpio (catálisis básica) siendo más favorable ambientalmente, reduciendo significativamente el potencial de toxicidad acuática.

3.1.7 Producción de Bioetanol a partir de pasta de microalga *Chlorella Vulgaris.*

En este caso se evaluó la producción de etanol carburante a partir de la pasta de microalgas *Chlorella Vulgaris* mediante técnicas de diseño conceptual formulando dos estructuras de proceso para la purificación del producto, mediante destilación extractiva y tamices moleculares con uso de solvente. Se resolvieron los balances de materia y energía mediante el simulador de procesos ASPEN PLUS v7.2, se evaluó económicamente el costo de producción de 1 litro de etanol mediante el paquete Aspen process econocmic analyzer y se evaluó ambientalmente el proceso con la ayuda del

software WAR GUI. Se obtuvo rendimientos de producto de 0.052 kg de etanol por kg de pasta de microalga con deshidratación por destilación extractiva y 0.048 kg de etanol por kg de pasta de microalga en tamices moleculares con uso de solvente. Los costos de producción obtenidos son de USD 2.06 por litro de etanol y USD 1.35 por litro de etanol para destilación extractiva y tamices moleculares con uso de solvente respectivamente. El potencial de impacto ambiental resultante de evaluar ambos procesos refleja que el PEI total de salida por kg de productos es mayor para el proceso con deshidratación mediante tamices moleculares con uso de solvente comparado con el de destilación extractiva debido a la carga residual de sus aguas de desperdicio. El proceso de producción de etanol a partir de microalgas es una opción que se debe seguir estudiando y explorando dado a su costo y que hace inviable su implantación a gran escala en la situación actual del país.

Modelación de la zona de reacción: Una vez extraído los aceites de la biomasa de microalga, la pasta residual se puede someter a un proceso de hidrólisis del contenido de almidón presente, y con ello, conseguir carbohidratos más simples que puedan ser asimilados por microorganismos fermentadores con proyección a transformar los azucares reductores en etanol y otros metabolitos de alto valor agregado. Para el caso de un aprovechamiento más integral, se contemplo un proceso integrado de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) de acuerdo al modelo propuesto por Kroumov y colaboradores (2006) [202]. En este modelo, se realiza la SFS con la cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae YPB-G* de acuerdo a las siguientes consideraciones:

- El modelo asume una actividad enzimática aditiva en el proceso de sacarificación del almidón (se suma la actividad de la glucoamilasa y alpha-amilasa durante el proceso de secreción por *Saccharomyces cerevisiae YPB-G*)
- La estructura del almidón puede ser considerada como una composición de dos fracciones en relación a su tasa de degradación.
- La tasa de la fracción susceptible de hidrólisis sobre la concentración depende de dos fracciones de almidón y su inhibición por ambos, tanto por la acción de la concentración de la glucosa y la fracción susceptible de almidón.

- La tasa de la fracción resistente a hidrólisis es una función de la concentración de dos fracciones de almidón y su inhibición por ambos, tanto la acción de la glucosa como de la concentración de la fracción de almidón resistente.
- Las limitaciones por transferencia de masa y cambios de conformación en la estructura de la enzima no son considerados.

El modelo integrado SFS se describe a continuación:

La tasa específica de crecimiento:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times Glu(t) \times \left(\frac{dS_{total}(t)}{S_0} \right)}{K_S + Glu(t)} \quad \textbf{(3.1)}$$

La tasa de producción de etanol:

$$q_p = \frac{q_{p_{\max}} \times Glu(t) \times Et(t) \times \left(1 - \frac{Et(t)}{Et_{\max}} \right)}{\left(K_{S1} + Glu(t) \right) \left(K_{ps1} + Et(t) + \frac{Et(t)^2}{K_{pi}} \right)} \quad \textbf{(3.2)}$$

Balance de biomasa:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu X(t) \quad \textbf{(3.3)}$$

Balance de producto:

$$\frac{dEt(t)}{dt} = q_p X(t) \quad \textbf{(3.4)}$$

Balance de glucosa:

$$\frac{dGlu(t)}{dt} = R_{Glfromation} - R_{Glutilization} \quad \textbf{(3.5)}$$

Donde

$$R_{Glformation} = 1{,}111 \left(R_{sus} + R_{res} \right) \quad \textbf{(3.6)}$$

$$R_{glutulization} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX(t)}{dt} + \frac{1}{Y_{p/S}} \frac{dEt(t)}{dt} \quad \textbf{(3.7)}$$

$$R_{sus} = \frac{k_{sus} \times Enz(t) \times S_{sus}(t)}{K_m \left(1 + \frac{Glu(t)}{K_{glu}}\right) + \frac{S_{sus}(t)^2}{K_{starch}} + S_{sus}(t) + S_{res}(t)} \quad \textbf{(3.8)}$$

$$R_{res} = \frac{k_{res} \times Enz(t) \times S_{res}(t)}{K_m \left(1 + \frac{Glu(t)}{K_{glu}}\right) + \frac{S_{res}(t)^2}{K_{starch}} + S_{sus}(t) + S_{res}(t)} \quad \textbf{(3.9)}$$

$$\frac{dS_{sus}(t)}{dt} = -R_{sus} \quad \textbf{(3.10)}$$

$$\frac{dS_{res}(t)}{dt} = -R_{res} \quad \textbf{(3.11)}$$

$$\frac{dS_{total}(t)}{dt} = \frac{dS_{sus}(t)}{dt} + \frac{dS_{res}(t)}{dt} \quad \textbf{(3.12)}$$

Balance de enzima:

$$\frac{dEnz(t)}{dt} = R_{enz} - (\mu + \beta) \times Enz(t) \quad \textbf{(3.13)}$$

Donde

$$R_{enz} = \frac{(\mu_{\max} + \beta) \times Enz_{\max} \times S_{total}(t)}{K_{enz} + S_{total}(t)} \quad \textbf{(3.14)}$$

Ó

$$\frac{dEnz(t)}{dt} = R_{enz} - \mu Enz(t) - \beta Enz(t) \quad \textbf{(3.15)}$$

La lista de parámetros y abreviaturas se encuentran en la Tabla 3-14 y Tabla 3-14.

Los balances de materia asumiendo operación isotérmica se resumen en la ecuación generalizada de un fermentador de mezcla completa y operación continua (CSTBR) así:

$$\boldsymbol{D(M - M_o) = \pm rM} \quad \textbf{(3.16)}$$

Donde D es la tasa de dilución, M es cualquier metabolito considerado en el modelo SFS y rM es la tasa de reacción del metabolito M.

Se realizó la evaluación técnica de la producción de Bioetanol de microalgas mediante la síntesis conceptual de dos estructuras de proceso una convencional y otra no convencional de purificación del etanol a nivel anhidro. Los balances de masa y energía se resolvieron en el software comercial ASPEN PLUS v7.2 utilizando como modelo termodinámico de cálculo el NRTL con la modificación de Hayden-O'Conell para la fase de vapor debido a la presencia de ácidos orgánicos de la ruta metabólica de las microalgas y la levadura durante los procesos de hidrólisis y fermentación. La evaluación económica del proceso se llevo a cabo exportando los datos de la simulación al paquete de Aspen Process Economic Analyzer para ambas estructuras formuladas y se comparo los costos de producción en ambos casos.

Tabla 3-13: Lista de abreviaturas necesarias para la comprensión del modelo SFS

Abreviatura	Significado
Enz	Concentración de enzima (U/m^3)
Et	Concentración de etanol (Kg/m^3)
Glu	Concentración de glucosa (Kg/m^3)
k	Contante de tasa (Kg/U/h)
K	Constante de inhibición y saturación (Kg/m^3)
$\mathbf{K_m}$	Constante de Michaelis (Kg/m^3)
tPer	Porcentaje perceptible de almidón
$\mathbf{q_p}$	Tasa específica de producción de etanol (1/h)
R	Tasa de utilización de almidón ($Kg/m^3/h$)
$\mathbf{R_{enz}}$	Tasa de síntesis de enzima ($U/m^3/h$)
$\mathbf{R_{Glformation}}$	Tasa de formación de glucosa ($Kg/m^3/h$)
$\mathbf{R_{Glutilization}}$	Tasa de utilización de glucosa ($Kg/m^3/h$)
S	Concentración de almidón (Kg/m^3)
t	Tiempo (h)
X	Concentración de biomasa (Kg/m^3)
$\mathbf{Y_{p/s}}$	Rendimiento de producto(Kg/Kg)
$\mathbf{Y_{X/S}}$	Rendimiento de crecimiento celular (Kg/Kg)
B	Tasa de degradación de enzima (1/h)
μ	Tasa específica de crecimiento (1/h)
0	Inicial
max	Máximo
res	Almidón resistente
sus	Almidón perceptible
total	Total

Tabla 3-14: Parámetros estequiométricos y cinéticos del modelo SFS [202]

Parámetros		**Valor**
B	(1/h)	0.05
K_{enz}	(kg/m^3)	1
Enz_{max}	(U/m^3)	6
K_m	(kg/m^3)	0.406
k_{sus}	(kg/U/h)	0.0537
k_{res}	(kg/U/h)	0.0030
K_{strach}	(kg/m^3)	66.7
K_{Glu}	(Kg/m^3)	2.132
Per		0.786
μ_{max}	(1/h)	0.098
$Y_{x/s}$	(kg/kg)	0.512
K_s	(Kg/m^3)	0.292
Et_{max}	(kg/m^3)	20.8
$q_{p,max}$	(1/h)	0.415
$Y_{p/s}$	(Kg(Kg)	0.301
K_{sl}	(kg/m^3)	1.924
K_{psl}	(kg/m^3)	0.783
K_{pil}	(kg/m^3)	210

De forma análoga, se realizó la evaluación de impacto ambiental en el software de la FAO, WAR aplicando la metodología del algoritmo de reducción de residuos.

Resultados: El diagrama de flujo de proceso propuesto para ambas estructuras se muestra en la Figura 3-23 y Figura 3-24. En ambos casos, una corriente de nutrientes, levadura *Saccharomyces cerevisiae YPB-G* y pasta de microalga *Chlorella Vulgaris* se alimentan un biorector de mezcla perfecta y flujo continuo (CSTBR) para someterse a un proceso de sacarificación y fermentación simultánea. La corriente de salida del CSTBR se centrifuga y se separa la biomasa residual y el caldo de cultivo para luego, ingresarse a una unidad de absorción de CO_2 antes de deshidratarse en una columna de destilación simple para eliminar las vinazas. A partir de este punto, se generaron dos estructuras de purificación de etanol anhidro: **i) Destilación extractiva:** la mezcla de etanol-agua se ingresa a un tren de destilación que consta de 4 torres de destilación alimentadas con solvente etilenglicol para burlar el azeotropo entre la mezcla binaria (ver Figura 3-23). **ii) Deshidratación por tamices moleculares con uso de solventes:** La mezcla de etanol-agua se alimenta a una torre de destilación con adición de solvente etlienglicol para separar el agua en abundancia y mover el azeótropo de la mezcla y se ingresa a una unidad de tamices moleculares de adsorción-desorción para obtener etanol anhidro (ver

Figura 3-24). En cada estructura se integra másicamente el proceso mediante reciclos de solvente y aprovechamiento de las corrientes útiles como fluidos de servicio. Los balances de materia y energía de ambos estructuras se observan en la Tabla 3-15. Se obtuvo rendimientos de **0.052 kg de etanol por kg de pasta de microalga por destilación extractiva y 0.048 kg de etanol por kg de pasta de microalga en tamices moleculares**. La demanda energética calculada para las estructuras fue de 27.02 KW por kg de etanol producido y 28.96 KW por kg de etanol producido por destilación-extractiva y tamices moleculares respectivamente. La evaluación económica y de impacto ambiental de ambas estructuras contempladas se visualiza en la Tabla 3-16 y la Figura 3-25 respectivamente.

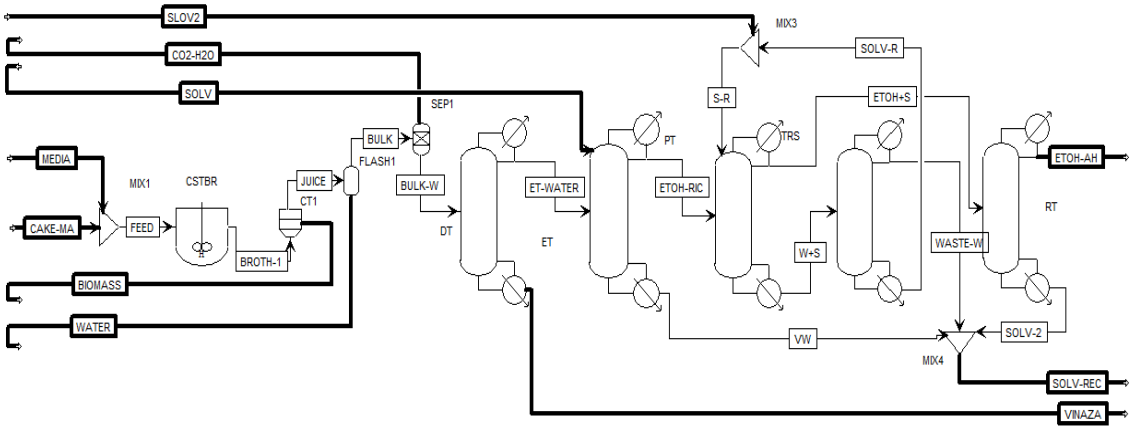

Figura 3-23: Diagrama de flujo de proceso de producción de etanol a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris*: Destilación-extractiva

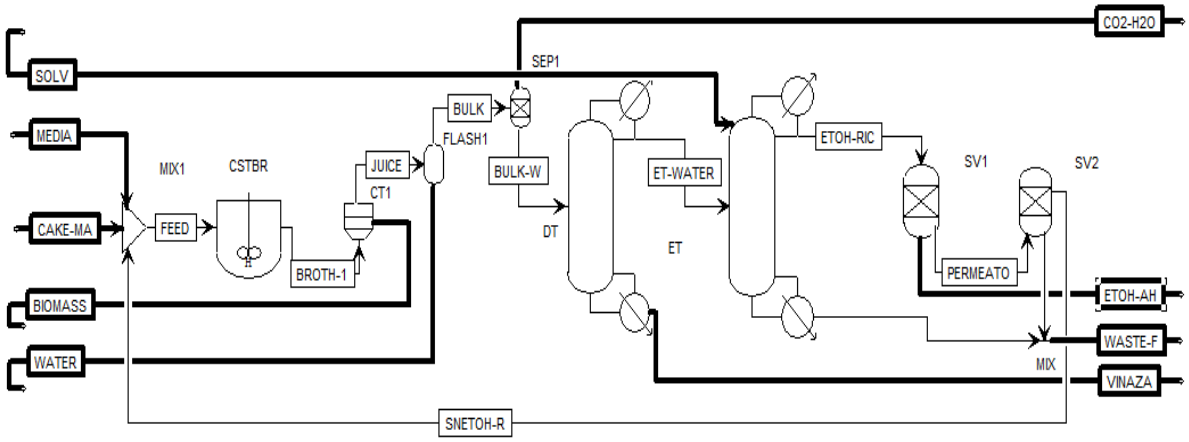

Figura 3-24: Diagrama de flujo de proceso de producción de etanol a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris*: tamices moleculares con uso de solvente

Tabla 3-15: Resumen del balance de materia y energía la producción de Bioetanol de microalga

	Destilación-extractiva	**Tamices Moleculares**
Materia Prima	**Flujo (kg/h)**	**Flujo (kg/h)**
Pasta de microalga	569.51	569.51
Medio de cultivo	3859.624	3852.884
Solvente	3920.671	0.040
Productos	**Flujo (kg/h)**	**Flujo (kg/h)**
Biomasa	137.377	137.377
Proteína húmeda	1747.802	1747.802
Vinazas	801.875	801.875
Solvente recuperado/Agua de residuo	4361.930	436.699
Agua carbonatada	1271.470	1271.470
Etanol @99.7 % (masa)	29.391	27.227
Energía (KW)	794.15	788.39

Tabla 3-16: Evaluación económica de la producción de Bioetanol de microalgas

	Destilación extractiva	**Tamices Moleculares**
Costo	**USD/Kg**	**USD/Kg**
Materia prima	0,000282	0,000282
Total de utilidades	0,0207	0,00362
Labor Operativa	0,00376	0,00226
Mantenimiento	0,00368	0,000142
Cargos operativos	0,000941	0,000565
Gastos generales	0,00372	0,00120
Generales y Administrativos	0,00999	0,000645
Total de producción	0,0428	0,0279
Etanol 99,8 %	**USD/L**	**USD/L**
Costo de producción	2,076	1,352

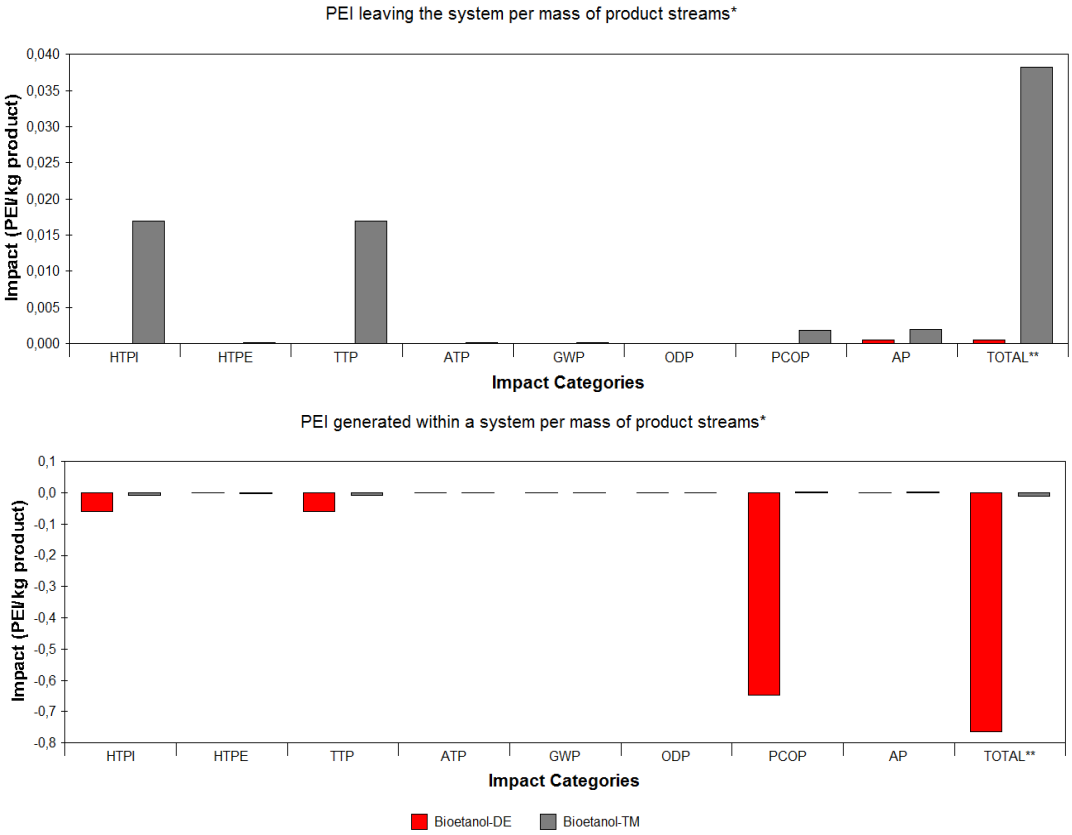

Figura 3-25 : Evaluación ambiental de la producción de etanol de microalga *Chlorella vulgaris*

Discusión: Se puede observar en la Tabla 3-16 que el costo de producir un litro de etanol utilizando una tecnología de deshidratación por destilación extractiva es mas elevada que por la tecnología de tamices moleculares con uso de solvente. La razón que sustenta este hecho se basa en el costo fijo, que es superior dado a la cantidad de equipos necesarios en el tren de destilación que demanda este escenario (ver Figura 3-23) A su vez, el panorama de la producción de Bioetanol de microalga en primera instancia no es alentador, ya que en comparación al precio de venta en el contexto colombiano (**USD 1.18 por litro,** Fuente: Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia 2011) cada escenario es **1.75** y **1.14** veces más caro por destilación extractiva y por tamices moleculares con uso de solvente respectivamente. El análisis ambiental del proceso refleja que la tecnología aplicada de separación y purificación enmarcada dentro de un proceso eficiente de sacarificación-fermentación para aumentar el rendimiento de etanol ejerce una influencia en la cantidad de potencial de impacto ambiental por Kg de productos emitidos ya que la tecnología de tamices moleculares con uso de solvente en

su configuración emite corrientes de aguas de residuo con una carga nociva debido a la presencia de trazas de solventes y vinazas que contribuyen a generar una alarma dentro de la fauna y humanidad de los alrededores (HTPI y TTP). A su vez, si se compara las vinazas de este proceso con las emitidas por un proceso tradicional de producción de etanol a partir de maíz y caña de azúcar (estudio realizado por Quintero y Cardona (2008) [203].) como se observa en la figura 3-26, las vinazas y corrientes de residuo son más contaminantes que las de proceso a partir de maíz y caña de azúcar. Este resultado es muy contundente, debido a que abre una perspectiva a futuro para intensificar el proceso de producción de etanol a partir de microalgas debido a que sus vinazas, un problema a nivel mundial de la industria del alcohol carburante, son menos nocivas y con mayor potencial hacia la producción de fertilizantes.

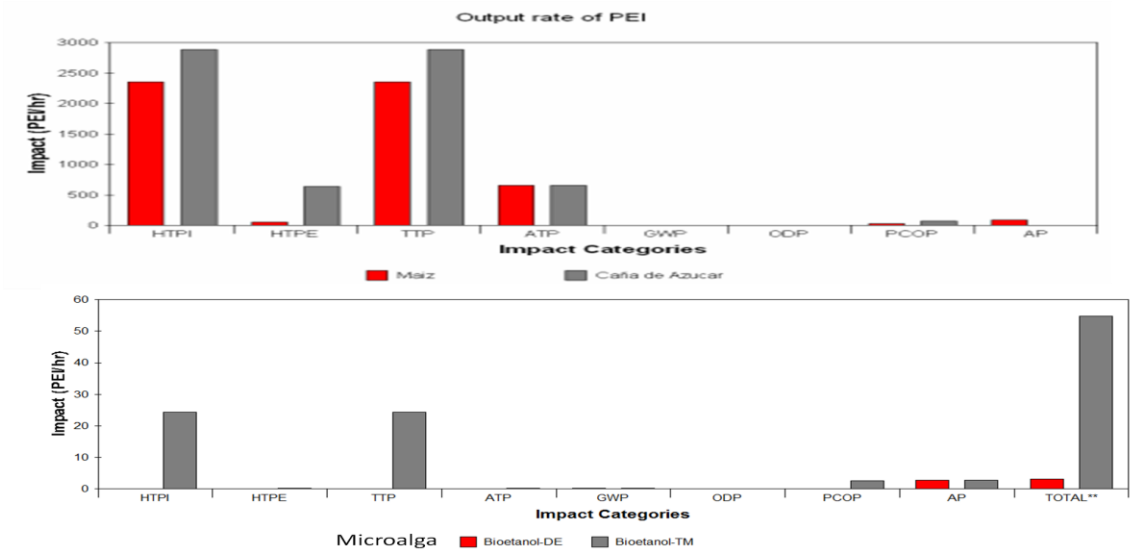

Figura 3-26: Comparación del impacto ambiental de la producción de Bioetanol a partir de maíz-caña y microalgas

3.2 Crecimiento experimental de microalgas *Chlorella Vulgaris y Chlorella protothecoides*

Crecimiento Heterotrófico: La evaluación del crecimiento de biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris y Chlorella protothecoides* se realizó bajo condiciones de crecimiento heterotrófico y fototrófico como se describió en la metodología. Los resultados de la

recuperación del crecimiento de biomasa de ***Chlorella Vulgaris*** a condiciones heterotróficas en un medio de cultivo de 700 mL en un sistema cerrado tipo bioreactor agitado a condiciones de ciclo de luz natural y oscuridad nocturna durante 8 días con sustrato glucosa se observan en la Tabla 3-17.

Tabla 3-17: Recuperación de biomasa de la microalga *Chlorella Vulgaris* mediante filtración al vacio.

Numero de papel filtro	Peso papel filtro vacío $[mg]$	Peso papel filtro con biomasa, $[mg]$	Peso de biomasa recuperada, $[mg]$
1	864.6	868.4	3.8
2	880.3	882.1	1.8
3	859	934.2	75.2
4	890.6	1010.8	120.2
5	885.1	1136.8	251.7
6	768.4	857.8	89.4
Total	**5148**	**5690.1**	**542.1**

El rendimiento calculado de biomasa extraída a partir del caldo de cultivo resultó igual a **903.5 mg de biomasa microalgal por litro de caldo de cultivo.**

A su vez es de interés recuperar los metabolitos de la biomasa de microalga, para lo cual se somete a una extracción tipo soxhlet con solvente acetona-etanol. Los resultados de la extracción se visualizan en la Tabla 3-18.

A partir de la tabla 3-18 se puede calcular la cantidad de aceite extraída y los rendimientos de aceite y pasta resultando:

$$Aceite = Peso\ de\ biomasa - Peso\ de\ pasta\ recuperada = 0.4527g - 0.2741g = 0.1786\ g$$

$$Rendimiento\ de\ aceite = \frac{Peso\ de\ Biomasa - Peso\ de\ pasta\ recuperada}{Peso\ de\ Biomasa\ Total} = \frac{0.1786\ g}{0.4527\ g}$$

$$= 0.3945 \frac{g\ Aceite}{g\ Biomasa\ seca}$$

$$Rendimiento\ de\ Pasta = \frac{Peso\ de\ pasta\ recuperada}{Peso\ de\ Biomasa\ Total} = \frac{0.2741\ g}{0.4527\ g} = 0.6055 \frac{g\ Pasta}{g\ Biomasa\ seca}$$

Tabla 3-18: Extracción de aceites con solventes y recuperación de pasta de microalga

Papel filtro	Peso papel filtro antes de la extracción, $[mg]$	Peso papel filtro después de la extracción, $[mg]$	Peso pasta recuperada, $[mg]$	Peso biomasa, $[mg]$
1	868.4	853.5	14.9	3.8
2	882.1	832.7	49.4	1.8
3	934.2	896.2	38	75.2
4	1010.8	930.4	80.4	120.2
5	1136.8	1045.4	91.4	251.7
Total	**4832.3**	**4558.2**	**274.1**	**452.7**

Los rendimientos obtenidos para el cultivo de las microalgas y la extracción de aceites resultan ser buenos y de competencia con los reportados en la Tabla 1-3 y Tabla 1-7 y varios investigadores como Chisti (2007) [1].

Las observaciones más notorias durante el crecimiento de microalga *Chlorella Vulgaris* es el cambio de color de las microalgas dependiendo de la iluminación sometida. A condiciones de oscuridad, exteriorizan un color verde, tal vez debido a las cianelas en su interior. A condiciones de luz blanca, las microalgas toman un color blanco y después de un tiempo mayor a 8 días sufren un deterioro debido al daño fotoxidativo debido a la saturación por luz y oxigeno en el medio, que las lleva a expresar un color naranja y olor característico.

De forma análoga se evaluó el crecimiento heterotrófico de la microalga *Chlorella protothecoides* después de muchos ensayos hasta conseguir un medio de cultivo adecuado para su crecimiento (ver Tabla 2-1). Se preparó un medio de reacción de 1.6 itros en un bioreactor de tanque agitado a régimen de luz continua y constante con una fuente de tipo Led que se describirá más adelante. El sustrato utilizado fue glucosa y las condiciones de temperatura se mantuvieron constantes a 30°C. Los resultados del crecimiento de biomasa algal se pueden observar en la Tabla 3-19.

El rendimiento obtenido a partir de la tabla 3-19 es **0.075 gramos de biomasa de microalga por cada litro de caldo de cultivo.**

El rendimiento obtenido hace de la extracción de metabolitos una tarea imposible debido a que la cantidad de biomasa es demasiado pequeña para los métodos y técnicas empleados en laboratorio.

Tabla 3-19: Recuperación de biomasa de microalga *Chlorella Protothecoides* mediante filtración al vacio.

$Numero$	Papel filtro vacío, $[mg]$	Peso con biomasa, $[mg]$	Biomasa, $[mg]$
1	791	-	-
2	762	825	63
3	829	851	22
4	796	801	5
5	790	820	30
Total	**3177**	**3297**	**120**

Es importante analizar porque se obtiene unos rendimientos tan pequeños; para ello, se monitorea mediante el conteo celular en cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la figura 3-27. Es un cuadrado de 3x3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada con **L** corresponde a 1 mm^2. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie **L** y el cubreobjetos es de 0.1 mm^3.

A partir de la contextualización del conteo celular por cámara de Neubauer se deriva la ecuación universal para encontrar la concentración de células viables cuando tienen tinción por mL de solución así:

$$\frac{\boldsymbol{células}}{\boldsymbol{mL}} = \left(\frac{\boldsymbol{Número\ total\ de\ céulas\ contadas * Factor\ de\ dilución * 1000mm^3}}{\boldsymbol{4 * Superficie\ contada\ (mm^2) * produndidad\ de\ la\ cámara(mm) * 1mL}}\right) \quad \textbf{(3.17)}$$

Aplicando la ecuación 3.17 se construye la gráfica de crecimiento en fase exponencial para la microalga (ver figura 3-28) y se calculan los parámetros cinéticos de número de generaciones **(n)**, tiempo de generación **(g)** y la constante de velocidad específica de crecimiento **(K)**.

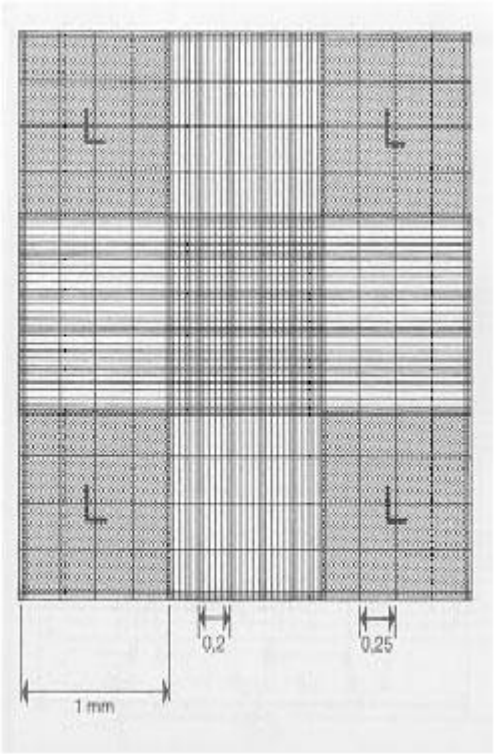

Figura 3-27: Ilustración de la cámara de Neubauer

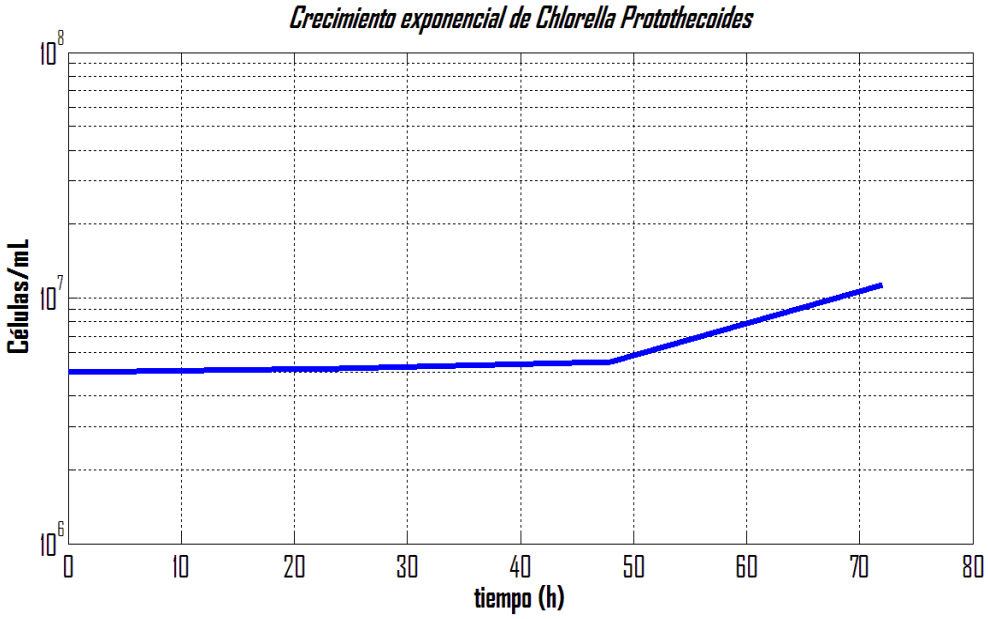

Figura 3-28: Representación semilogarítimica del crecimiento heterotrófico en fase exponencial de la microalga *Chlorella protothecoides*

Para calcular los parámetros mencionados, se desarrollan matemáticamente las expresiones de crecimiento exponencial de microorganismos sabiendo que el aumento del número de células que se produce es una progresión geométrica de base 2, por lo que existe una relación directa entre el número inicial de células (**No**) y el número final de las mismas (**N**) tras el número de generaciones que hayan ocurrido (**n**), así:

$$\mathbf{N = No * 2^{n}} \quad \textbf{(3.18)}$$

Donde sí se despeja **n** la ecuación resulta:

$$\boldsymbol{n = 3.3(\log N - \log No)} \quad \textbf{(3.19)}$$

Conociendo n y el tiempo de crecimiento exponencial (**t**) podemos calculas **g** a partir de la expresión:

$$\boldsymbol{g = \frac{t}{n}} \quad \textbf{(3.20)}$$

De la figura 3-28 y aplicando las ecuaciones (3.18 a 3.20) se obtiene que para la microalga *Chlorella protothecoides* crecida hetetróficamente el número de generaciones es **n=1.18**, el tiempo de generación **g=20.43 h** y la constante de velocidad específica de crecimiento es **K=0.05 h^{-1}**.

Se puede analizar de los resultados obtenidos, que el tiempo de generación de la microalga *Chlorella protothecoides* es muy alto, y para obtener una densidad de biomasa apreciable para una extracción de metabolitos, se hace necesario que el cultivo se lleve a cabo durante un prolongado tiempo de cultivo, que haría improductivo el proceso a nivel industrial. Dicho tiempo de generación y un rendimiento de biomasa a caldo de cultivo tan bajo y que no es comparable con los resultados que se observan en la literatura lleva a evaluar si es viable considerar esta alga para una producción intensiva de metabolitos en el contexto colombiano. Es de aclarar además, que el medio recomendado por el proveedor al cual se le adquirió la microalga (The algae cultura of UTEX) no fue asimilado por ésta para crecer a nivel de laboratorio en el Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, haciendo que se ensaye con otros medios hasta conseguir un medio adecuado para su crecimiento. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados como revelan los cálculos.

Crecimiento Autotrófico: debido a los resultados encontrados evaluando el crecimiento heterotrófico de las microalgas *Chlorella Vulgaris y Chlorella protothecoides* se optó por intensificar esfuerzos en el crecimiento del alga más prometedora experimentalmente, es decir la *Chlorella Vulgaris*. Para ello, se realizó el crecimiento en un fotoreactor diseñado por el grupo de investigación en Procesos Químicos Catalíticos y Biotecnológicos en el Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales para el propósito de ésta tesis. Se preparó un medio de cultivo de 2 Litros con las especificaciones de la tabla 2-1, pero cambiando la fuente de carbono y sustrato por CO_2 en una proporción de 5 a 15%(v/v). La iluminación se realizó en un laboratorio con una iluminación alta, de alrededor de 1000 lux en día común de Manizales y una fuente de iluminación constante de tipo led que consta de una cinta de 5m 3M de 300 led's con una eficiencia de 150 lúmen/W que ilumina alrededor de 2000 lux. En la figura 3-29 se puede observar el equipo instalado y funcionando.

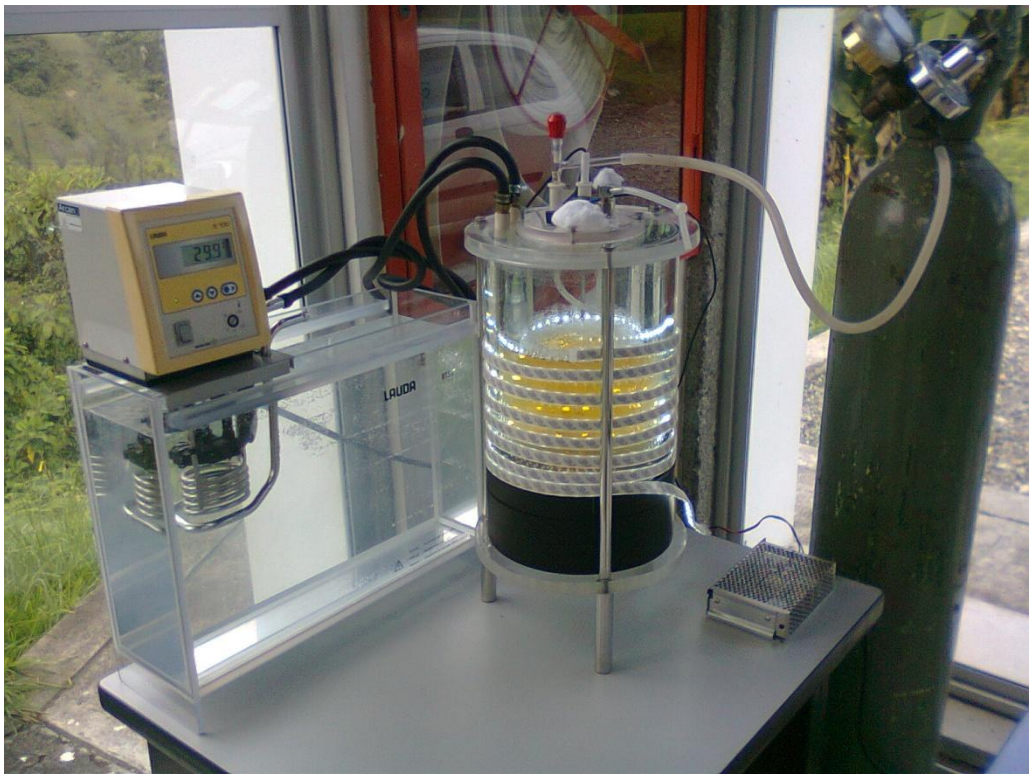

Figura 3-29: Fotoreactor instalado y funcionando para la microalga *Chlorella vulgaris*

En la tabla 3-20 se puede observar los resultados de la biomasa extraída del caldo de cultivo después de un monitoreo de 5 días. Se midió la concentración celular mediante conteo por cámara de Neubauer como se explicó anteriormente y se calcularon los parámetros cinéticos de crecimiento como se dilucidó en las ecuaciones 3.18 a 3.20.

Tabla 3-20: Extracción de biomasa C*hlorella Vulgaris* mediante filtración al vacio crecida en fotoreactor

Numero	Papel filtro vacío, $[g]$	Peso con biomasa, $[g]$	Biomasa, $[g]$
1	0.812	0.964	0.152
2	0.81	0.851	0.041
Total	**1.622**	**1.815**	**0.193**

El rendimiento de de biomasa microalgal fue de **0.0965 gramos de microalga por litro de caldo de cultivo.** La curva de crecimiento exponencial se puede observar en la figura 3-30.

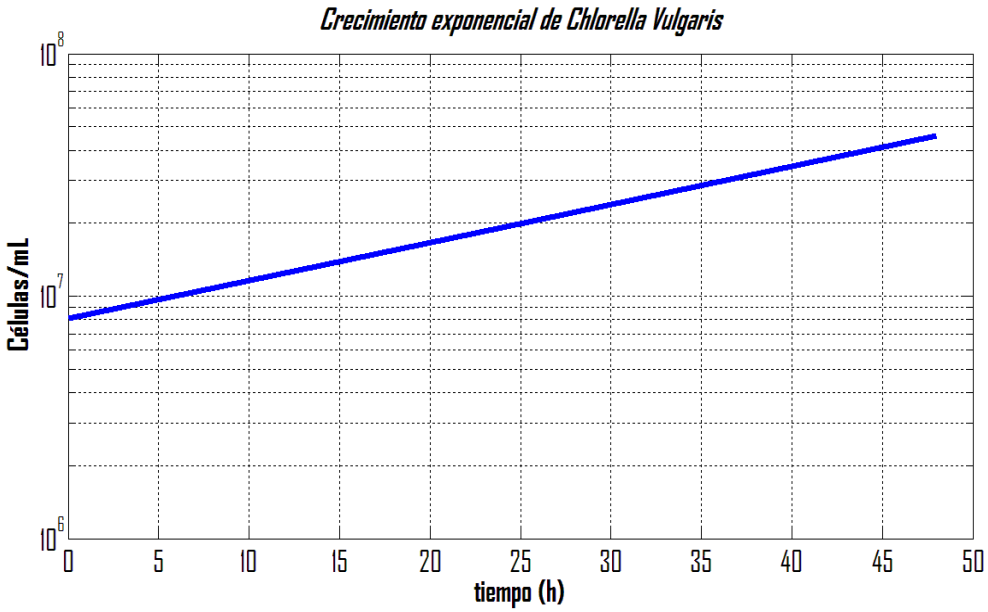

Figura 3-30: Representación semilogarítmica del crecimiento exponencial de la microalga Chlorella Vulgaris en Fotoreactor

El número de generaciones resulto de **n=2.5** con n un tiempo de generación de **g=9.64 h** y una tasa de velocidad específica de crecimiento de **K=0.104 h^{-1}**.

Los resultados muestran que se tiene un buen rendimiento de biomasa en medio autotrófico, sin embargo, el medio heterotrófico de crecimiento ofrece un resultado muy

superior, de **9.36 veces mayor**. El tiempo de generación de biomasa es bueno y comparable con lo informado por Chisti entre otros [1, 2, 31] y hace evidente que las microalga *Chlorella vulgaris* a nivel industrial podría ser intensificada y aplicada para la producción de biocombustibles y otros metabolitos en el contexto colombiano. Además, hay que hacer relevancia en que el cultivo en medio heterotrófico favorece el control y la productividad de la biomasa, sin embargo, maneja volúmenes más pequeños de operación que el autotrófico en fotoreactor y el tipo abierto o piscina. La ventaja de un medio autotrófico sobre el heterotrófico radica en que su sustrato puede ser una corriente de gases industriales cuyas especificaciones para el crecimiento de microalgas se pueden observar en la tabla 3-22, y por esta razón, y al utilizar una corriente de residuos y convertirla en biomasa con potencial a transformarse a metabolitos de alto valor agregado, la carga ambiental se ve disminuida y su impacto es muy positivo sobre el ecosistema.

Crecimiento Abierto: Se evaluó como blanco el potencial de crecimiento de biomasa de microalga *Chlorella Vulgaris* en un medio abierto a condiciones ambientales de temperatura, humedad y contaminación por efecto de microorganismos invasores. Como era de esperarse, al segundo día de monitoreo, se pudo observar que el medio estaba completamente contaminado por acción de hongos y otros organismos típicos en ambiente, haciendo que las microalgas se inhibieran, y después de 8 días de observación, no se aprecie su presencia.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran que a nivel técnico-teórico es posible utilizar la microalga *Schizochytrium* sp. N-2, como materia prima de una biorefinería generadora de tres productos de valor agregado con demanda en los mercados químico, de alimentos y combustibles, tal y como son el gas de síntesis, el omega 3, el biodiesel. Las calidades de los productos resultaron acordes en cierta medida con los requerimientos industriales en especial el omega 3 y el gas de síntesis que por su alto contenido de hidrocarburos resulta apto para ser empleado como combustible en sistemas de cogeneración o celdas combustibles. En cuanto el biodiesel aunque este no alcanzó los estándares de calidad para ser empleado en mezclas B100, su nivel de pureza y densidad lo hacen apto para ser usado en mezclas menores a B5, requiriendo ser combinado con otros tipos de biodiesel para empezar a ser usado en proporciones superiores a B5. Finalmente, la comparación de los métodos de extracción de aceite de microalga reveló como a pesar de su mayor complejidad técnica, la lisis celular tiene un consumo energético global menor comparado con la extracción con solventes dado que este proceso carece de la etapa de purificación del solvente para su recirculación que es una etapa crítica en cuanto al consumo de energía de calentamiento, logrando el mismo cometido con una mayor pureza del aceite obtenido. Lo anterior tiene como consecuencia lógica un efecto sobre el resto de la biorefinería en cuanto a disminución del consumo energético global, pureza de los productos obtenidos y menor generación de residuos que puede apreciarse en su menor PEI generado, que se traduce en una mayor amabilidad comparativa con el ambiente. De esta manera puede decirse que basados en los resultados del presente trabajo puede continuarse hacia una evaluación de factibilidad de la biorefinería basada en de la microalga *Schizochytrium* sp. N-2, incluyendo otros productos en su canasta de servicios tales como lubricantes gracias a las propiedades de los ácidos grasos EPA y DHA, que pueden ser obtenidos de la misma alga.

La biomasa de microalgas tiene un gran potencial para generar energía aprovechable. Tanto la gasificación de la pasta como la combustión directa del aceite de microalga *Schizochytrium* sp. N-2., muestran excelentes resultados en comparación a otras materias primas como la caña y el sorgo, revelándose como sostenible energéticamente; sin embargo, aun existe un interrogante grande en cuanto al pretratamiento de las microalgas y su gran demanda de energía de proceso, por lo que actualmente su balance de energía es medianamente positivo.

El panorama de la cascarilla de arroz como un residuo lignocelulósico con potencial para una biorefinería es prometedor. Su perspectiva desde la producción de biocombustibles refleja que es una materia prima apropiada para la generar energía vía biológica como Bioetanol o vía termoquímica como energía eléctrica. En ambos contextos, su sostenibilidad es alta y analizado desde la óptica del escenario contemplado y discutido en esta sección, su balance energético y potencial de los metabolitos producidos a la luz de integrar este escenario con la producción de biocombustibles de microalgas, vislumbra una superestructura sostenible a escala industrial. La reducción de residuos es marcada, al transformar un residuo en metabolitos de alto valor agregado y corrientes que se consideraban un desecho, en sustratos y materias primas en el contexto de una biorefinería de microalgas.

El cultivo de microalgas ofrece una enorme ventaja sobre otros cultivos vegetales cuyos metabolitos son potenciales para la producción de bocombustibles debido a su capacidad de asimilación de corrientes de residuo como fuente de alimento, y su metabolismo acelerado de crecimiento celular de forma contínua. Su prospectiva de un cultivo intensivo, abre un panorama muy claro para solventar la demanda de biocombustibles y sustitución de los combustibles fósiles. Su gran productividad y rendimiento por área de cultivo, y su flexibilidad de adapatación a ecosistemas con suficientes nutrientes y disponibilidad de agua, hace que en el marco colombiano, sea posible intensificar e implantar granjas algales que sustituyan con el tiempo en su mayoría los cultivos agroindustriales de materias primas para biodiesel y bioetanol. Al integrar al cultivo una biorefinería como la contemplada con la cascarilla de arroz, la demanda energética del proceso se disminuiría y haría aún mas rentable el proceso y los costos de producción de aceite y pasta de microalga.

En éste trabajo se implementó además una rutina de cálculo y la optimización del diseño de un fotoreactor para el crecimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* muestra resultados prometedores en los requerimiento de de luz y el tamaño adecuado. Confirmó la fuerte influencia de las zonas oscuras y de luz en el crecimiento de las microalgas, así como las características del fotoreactor, siendo una isla de crecimiento que nos da una buena aproximación al diseño y las mejores condiciones.

En cuanto a la tecnología a utilizar, la configuración más conveniente para la producción de biodiesel en países tropicales y subtropicales como Colombia es empleando aceite de microalgas y jatrofa con catalizador básico, integrando la cogeneración por combustión directa de biomasa con la torta de microalga y aceite de jatrofa. Esta configuración es posible para obtener altas tasas de biodiesel con bajos costos de producción, mejorado por la venta de electricidad. También, esta configuración prueba ser amigable con el ambiente con menores potenciales de emisión y efectos en el cambio climático, así como la reducción en el uso de la tierra por su habilidad de crecer en tierras marginales

La producción de Bioetanol a partir de microalgas *Chlorella vulgaris* ofrece un panorama alentador visto desde la perspectiva ambiental frente a los procesos tradicionales. Sin embargo, crea mayores expectativas su exploración tecnológica y profundización en mejorar los esquemas de producción de biomasa con mayor cantidad de carbohidratos y almidón que haga más rentable el proceso técnica y económicamente. Es necesario explorar aún más su potencial como materia prima apta para procesar y obtener etanol carburante, ya que los trabajos de investigación experimental en su mayoría se enfocan a estudios de producción de biodiesel e intensificación de la biomasa lipídica de la microalga.

Los resultados obtenidos a nivel experimental del crecimiento de biomasa microalga para la producción de biocombustibles en Colombia resulta ser prometedor para la microalga *Chlorella vulgaris* tanto heterotrófica y autotróficamente. Sin embargo, se debe intensificar en técnicas más rigurosas y de un ejercicio más intensivo para lograr que el proceso se pueda llevar a cabo a escala industrial. La perspectiva lleva a considerar la evaluación de más sustratos y variar condiciones que favorezcan la extracción de grandes volúmenes de metabolitos, lo cual haría competitivo el diseño de una biorefinería como se pudo constatar en esta tesis en la síntesis e ingeniería conceptual de procesos.

4.2 Recomendaciones

Para trabajos de investigación futuros en el área de la exploración de las microalgas dentro de una biorefinería sostenible, se recomienda hacer un énfasis especial en las etapas de secado dentro del cultivo de biomasa dado a que es decisivo al momento de definir la viabilidad económica del proceso.

Hacer hincapié en el estudio a profundidad de las microalgas viables a la producción de almidón y carbohidratos que pueden ser explotados como una potencial ruta y sustrato hacia la producción de alcohol carburante.

Estudiar a mayor profundidad las cepas nativas de microalgas en Colombia, haciendo énfasis en su adaptación diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

Buscar en diferentes zonas del país, microalgas termotolerantes que sean aptas para la producción de diferentes metabolitos y con altos contenidos de aceite, almidón, proteína, fibra que se puedan orientar hacia una biorefinería sostenible.

Para aumentar la rigurosidad de la modelación tecnológica del proceso, se recomienda medir experimentalmente las propiedades del aceite de microalga, tales como densidad, viscosidad, índice ácido entre otras.

Evaluar sustratos diferentes a la glucosa para el crecimiento experimental de las microalgas en medio heterotrófico. A ello, buscar alternativas en la formulación del medio de cultivo, buscando nutrientes más baratos que se puedan utilizar a gran escala en la industria.

Bibliografía

1. Chisti, Y., Biodiesel From Microalgae. Biotechnology Advances, 2007. 25: P. 294-306.
2. Chisti, Y., Biodiesel From Microalgae Beats Bioethanol. Trends In Biotechnology, 2007. 26: P. 126-131.
3. F. G. Aciehn Fernahndez, J.M.F.S., J. A. Sahnchez Pehrez, And Y.C. E. Molina Grima, Airlift-Driven External-Loop Tubular Photobioreactors For Outdoor Production Of Microalgae: Assessment Of Design And Performance. Chemical Engineering Science, 2001. 56: P. 2721-2732.
4. Xin Meng, J.Y., Xin Xu, Lei Zhang, Qingjuan Nie, Mo Xian, Biodiesel Production From Oleaginous Microorganisms Renewable Energy, 2009. 34: P. 1-5.
5. Grant, B.R. And I.M. Turner, Light-Stimulated Nitrate And Nitrite Assimilation In Several Species Of Algae. Comparative Biochemistry And Physiology, 1969. 29(3): P. 995-1004.
6. Khotimchenko, S.V. And I.M. Yakovleva, Lipid Composition Of The Red Alga Tichocarpus Crinitus Exposed To Different Levels Of Photon Irradiance. Phytochemistry, 2005. 66(1): P. 73-79.
7. Marshall, J.S. And Y. Huang, Simulation Of Light-Limited Algae Growth In Homogeneous Turbulence. Chemical Engineering Science. 65(12): P. 3865-3875.
8. Liang, Y., N. Sarkany, And Y. Cui, Biomass And Lipid Productivities Of Chlorella Vulgaris Under Autotrophic, Heterotrophic And Mixotrophic Growth Conditions. Biotechnology Letters, 2009. 31(7): P. 1043-1049.
9. Borowitzka, M.A., Commercial Production Of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes And Fermenters. Journal Of Biotechnology, 1999. 70: P. 313-321.
10. Jian-Ming Lv, L.-H.C., Xin-Hua Xu, Lin Zhang, Huan-Lin Chen, Enhanced Lipid Production Of Chlorella Vulgaris By Adjustment Of Cultivation Conditions. Bioresource Technology, 2010. 101: P. 6797–6804.
11. Spolaore, P., Et Al., Commercial Applications Of Microalgae. Journal Of Bioscience And Bioengineering, 2006. 101(2): P. 87-96.
12. Ayhan Demirbas, M.F.D., Importance Of Algae Oil As A Source Of Biodiesel. Energy Conversion And Management, 2010. 52: P. 163-170.
13. Bruno Sialve, N.B., Olivier Bernard, Anaerobic Digestion Of Microalgae As A Necessary Step To Make Microalgal Biodiesel Sustainable. Biotechnology Advances, 2009. 27: P. 409-416.
14. Chunfang Gao, Y.Z., Yi Ding, Qingyu Wu, Application Of Sweet Sorghum For Biodiesel Production By Heterotrophic Microalga Chlorella Protothecoides. Applied Energy, 2010. 87: P. 756–761.
15. Chun-Yen Chen, K.-L.Y., Rifka Aisyah, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang, Cultivation, Photobioreactor Design And Harvesting Of Microalgae For Biodiesel Production: A Critical Review. Bioresource Technology, 2011. 102: P. 71-81.

16. Xiaoling Miao, Q.W., Biodiesel Production From Heterotrophic Microalgal Oil. Bioresource Technology, 2006. 97: P. 841-846.
17. Rojan P. John, G.S.A., K. Madhavan Nampoothiri, Ashok Pandey, Micro And Macroalgal Biomass: A Renewable Source For Bioethanol. Bioresource Technology, 2011. 102: P. 186-193.
18. Amit Kumar, S.E., Xin Yuan, Ashi Sahu, Qiong Zhang, Jo Dewulf, F. Xavier Malcata, Herman Van Langelove, Enhanced CO2 Fixation And Biofuel Production Via Microalgae: Recent Developments And Future Directions. Trends In Biotechnology, 2010. 28: P. 371-380.
19. Xiong, W., Et Al., High-Density Fermentation Of Microalga Chlorella Protothecoides In Bioreactor For Microbio-Diesel Production. Applied Microbiology And Biotechnology, 2008. 78(1): P. 29-36.
20. Han Xu, X.M., Qingyu Wu, High Quality Biodiesel Production From A Microalga Chlorella Protothecoides By Heterotrophic Growth In Fermenters. Journal Of Biotechnology, 2006. 126: P. 499–507.
21. Sanchez T, O., Cardona A, C.A., Producción De Alcohol Carburante. Una Alternativa Para El Desarrollo Agroindustrial. 2007, Manizales, Caldas, Colombia.
22. Kadam, K.L., L.H. Forrest, And W.A. Jacobson, Rice Straw As A Lignocellulosic Resource: Collection, Processing, Transportation, And Environmental Aspects. Biomass And Bioenergy, 2000. 18(5): P. 369-389.
23. Qureshi, N., Et Al., Production Of Butanol (A Biofuel) From Agricultural Residues: Part II - Use Of Corn Stover And Switchgrass Hydrolysates. Biomass And Bioenergy. 34(4): P. 566-571.
24. Scott, S.A., Et Al., Biodiesel From Algae: Challenges And Prospects. Current Opinion In Biotechnology. In Press, Corrected Proof.
25. Harun, R., Et Al., Bioprocess Engineering Of Microalgae To Produce A Variety Of Consumer Products. Renewable And Sustainable Energy Reviews. 14(3): P. 1037-1047.
26. Fan, N.K.A.K.W., Polyunsaturated Fatty Acids Production By Schizochytrium Sp. Isolated From Mangrove. Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003. 25: P. 643-650.
27. Harun, R., Et Al., Bioprocess Engineering Of Microalgae To Produce A Variety Of Consumer Products. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 2011. 14(3): P. 1037-1047.
28. Liam Brennan, P.O., Biofuels From Microalgae—A Review Of Technologies For Production,Processing, And Extractions Of Biofuels And Co-Products. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 2009. Accepted.
29. Benemann, J.R., CO_2 Mitigation With Microalgae Systems. Energy Convers. Mgmi, 1997. 38: P. S475-S479.
30. Anondho Wijanarko , D., Arief Budi Witarto And Roekmijati Widaningroem Soemantojo, Effect Of Photoperiodicity On Co2 Fixation By Chlorella Vulgaris Buitenzorg In Bubble Column Photobioreactor For Food Supplement Production Makara, Teknologi, 2004. 8: P. 35-43.
31. E. Molina Grima, F.G.A.F., F. Garcıa Camacho, Yusuf Chisti, Photobioreactors: Light Regime, Mass Transfer, And Scaleup. Journal Of Biotechnology, 1999. 70: P. 231-247.
32. Aziz, M.A. And W.J. Ng, Feasibility Of Wastewater Treatment Using The Activated-Algae Process. Bioresource Technology, 1992. 40(3): P. 205-208.

33. Svoboda, K., Et Al., Integration Of Biomass Drying With Combustion/Gasification Technologies And Minimization Of Emissions Of Organic Compounds. Chemical Papers, 2009. 63(1): P. 15-25.
34. Cerón Garcia, M.C., Et Al., Mixotrophic Growth Of The Microalga Phaeodactylum Tricornutum: Influence Of Different Nitrogen And Organic Carbon Sources On Productivity And Biomass Composition. Process Biochemistry, 2005. 40(1): P. 297-305.
35. Khalil, Z., Et Al., Effect Of Ph On Growth And Biochemical Responses Of Dunaliella Bardawil And Chlorella Ellipsoidea. World Journal Of Microbiology And Biotechnology. 26(7): P. 1225-1231.
36. Raul Muñoz, B.G., Algal–Bacterial Processes For The Treatment Of Hazardous Contaminants: A Review. WAT ER RESEARCH, 2006. 2006: P. 2799-2815.
37. Attilio Converti ∗ , A.A.C., Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, Marco Del Borghi, Effect Of Temperature And Nitrogen Concentration On The Growth And Lipid Content Of Nannochloropsis Oculata And Chlorella Vulgaris For Biodiesel Production. Chemical Engineering And Processing, 2009. 48: P. 1146–1151.
38. Goldman, J.C., C.B. Riley, And M.R. Dennett, The Effect Of Ph In Intensive Microalgal Cultures. II. Species Competition. Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology, 1982. 57(1): P. 15-24.
39. Schenk, P., Et Al., Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae For Biodiesel Production. Bioenergy Research, 2008. 1(1): P. 20-43.
40. Shinozaki, Y. And H.K. Kitamoto, Ethanol Production From Ensiled Rice Straw And Whole-Crop Silage By The Simultaneous Enzymatic Saccharification And Fermentation Process. Journal Of Bioscience And Bioengineering. 111(3): P. 320-325.
41. Harker, M., A.J. Tsavalos, And A.J. Young, Autotrophic Growth And Carotenoid Production Of Haematococcus Pluvialis In A 30 Liter Air-Lift Photobioreactor. Journal Of Fermentation And Bioengineering, 1996. 82(2): P. 113-118.
42. Tran, N.H., Et Al., Catalytic Upgrading Of Biorefinery Oil From Micro-Algae. Fuel, 2009. 89(2): P. 265-274.
43. Wei, A., Et Al., Effects Of Cassava Starch Hydrolysate On Cell Growth And Lipid Accumulation Of The Heterotrophic Microalgae Chlorella Protothecoides. Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009. 36(11): P. 1383-1389.
44. Andersen, T. And F.Ø. Andersen, Effects Of CO2 Concentration On Growth Of Filamentous Algae And Littorella Uniflora In A Danish Softwater Lake. Aquatic Botany, 2006. 84(3): P. 267-271.
45. Vismara, R., Et Al., Diet-Induced Variations In Fatty Acid Content And Composition Of Two On-Grown Stages Of Artemia Salina. Journal Of Applied Phycology, 2003. 15(6): P. 477-483.
46. Perez-Garcia, O., Et Al., Heterotrophic Cultures Of Microalgae: Metabolism And Potential Products. Water Research. 45(1): P. 11-36.
47. Li, Y., Et Al., Effects Of Nitrogen Sources On Cell Growth And Lipid Accumulation Of Green Alga Neochloris Oleoabundans. Applied Microbiology And Biotechnology, 2008. 81(4): P. 629-636.
48. Teoh, M.-L., Et Al., Influence Of Culture Temperature On The Growth, Biochemical Composition And Fatty Acid Profiles Of Six Antarctic Microalgae. Journal Of Applied Phycology, 2004. 16(6): P. 421-430.
49. Naghavi, B. And R.F. Malone, Algae Removal By Fine Sand/Silt Filtration. Water Research, 1986. 20(3): P. 377-383.

50. Aslan, S. And I.K. Kapdan, Batch Kinetics Of Nitrogen And Phosphorus Removal From Synthetic Wastewater By Algae. Ecological Engineering, 2006. 28(1): P. 64-70.
51. Rawat, I., Et Al., Dual Role Of Microalgae: Phycoremediation Of Domestic Wastewater And Biomass Production For Sustainable Biofuels Production. Applied Energy. In Press, Corrected Proof.
52. Raul Muñoz, C.K., Benoit Guieysse, Biofilm Photobioreactors For The Treatment Of Industrial Wastewaters. Journal Of Hazardous Materials, 2009. 161: P. 29-34.
53. Mulbry, W., S. Kondrad, And J. Buyer, Treatment Of Dairy And Swine Manure Effluents Using Freshwater Algae: Fatty Acid Content And Composition Of Algal Biomass At Different Manure Loading Rates. Journal Of Applied Phycology, 2008. 20(6): P. 1079-1085.
54. Hipolito. C. Crabbe. E., M.C., Zarrabal. O., Morales. M., Pineda. G., Florez. G., Hernandez. M., Ishizaki., A. , Bioconversion Of Industrial Wastewater From Palm Oil Processing To Butanol By Clostridium Saccharoperbutylacetonicum N1-4 (ATCC 13564). Journal Of Cleaner Production 2008. 16: P. 632-638.
55. Venkatesh, K.V., M.R. Okos, And P.C. Wankat, Kinetic Model Of Growth And Lactic Acid Production From Lactose By Lactobacillus Bulgaricus. Process Biochemistry, 1993. 28(4): P. 231-241.
56. Shin, H.-J., J.-M. Park, And J.-W. Yang, Continuous Production Of Galacto-Oligosaccharides From Lactose By Bullera Singularis [Beta]-Galactosidase Immobilized In Chitosan Beads. Process Biochemistry, 1998. 33(8): P. 787-792.
57. Al-Muftah, A.E. And I.M. Abu-Reesh, Effects Of Internal Mass Transfer And Product Inhibition On A Simulated Immobilized Enzyme-Catalyzed Reactor For Lactose Hydrolysis. Biochemical Engineering Journal, 2005. 23(2): P. 139-153.
58. Oberoi, H.S., Et Al., Enhanced Ethanol Production Via Fermentation Of Rice Straw With Hydrolysate-Adapted Candida Tropicalis ATCC 13803. Process Biochemistry. 45(8): P. 1299-1306.
59. Shinto. H., T.Y., Kobayashi. T., Sekiguchi. T., Hanai. T., Kuriga Y., Okamoto. M., Sonomoto., K., Kinetic Study Of Substrate Dependency For Higher Butanol Production In Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation. Process Biochemistry 2008. 43: P. 1452-1461.
60. Demirbas, A., Use Of Algae As Biofuel Sources. Energy Conversion And Management, 2010. 51: P. 2738–2749.
61. Harwood, J.L. And I.A. Guschina, The Versatility Of Algae And Their Lipid Metabolism. Biochimie, 2009. 91(6): P. 679-684.
62. Henderson, R., S.A. Parsons, And B. Jefferson, The Impact Of Algal Properties And Pre-Oxidation On Solid-Liquid Separation Of Algae. Water Research, 2008. 42(8-9): P. 1827-1845.
63. Heng, L., Et Al., Algae Removal By Ultrasonic Irradiation-Coagulation. Desalination, 2009. 239(1-3): P. 191-197.
64. Pei, H.-Y., Et Al., Alga-Lysing Bioreactor And Dominant Bacteria Strain. Journal Of Environmental Sciences, 2007. 19(5): P. 546-552.
65. Chronakis, I.S., Et Al., The Behaviour Of Protein Preparations From Blue-Green Algae (Spirulina Platensis Strain Pacifica) At The Air/Water Interface. Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects, 2000. 173(1-3): P. 181-192.
66. Muhs, J.E.A., A Summary Of Opportunities, Challenges, And Research Needs-Algae Biofuels And Carbon Reciclyng. Report From Utah State University, 2009.

67. Eduardo Jacob-Lopes, S.R., Sergio Hernández, Keiko Shirai, Telma Teixeira Franco, Development Of Operational Strategies To Remove Carbon Dioxide In Photobioreactors. Chemical Engineering Journal, 2009. 153: P. 120-126.
68. Demirbas, A., Biodiesel From Oilgae, Biofixation Of Carbon Dioxide By Microalgae: A Solution To Pollution Problems. Applied Energy. In Press, Corrected Proof.
69. IEA Energy Technology Essentials - Biomass For Power Generation And CHP. www.Iea.Org; Www.Ieabioenergy.Com; International Bio-Energy Partnership (www.Fao.Org);Energy Technology Perspectives (IEA, 2006); World Energy Outlook (IEA, 2006); REN21 Global Status Report2005 And Update 2006 (www.Ren21.Net), 2007.
70. Faaij, A., Modern Biomass Conversion Technologies. Mitigation And Adaptation Strategies For Global Change, 2006. 11(2): P. 335-367.
71. E. Molina Grima, E.-H.B., F.G. Acien Fernandez, And Y.C. A. Robles Medina, Recovery Of Microalgal Biomass And Metabolites: Process Options And Economics. Biotechnology Advances, 2003. 20: P. 491-515.
72. Piorreck, M., K.-H. Baasch, And P. Pohl, Biomass Production, Total Protein, Chlorophylls, Lipids And Fatty Acids Of Freshwater Green And Blue-Green Algae Under Different Nitrogen Regimes. Phytochemistry, 1984. 23(2): P. 207-216.
73. Jin Liu, J.H., Zheng Sun, Yujuan Zhong, Yue Jiang, Feng Chen, Differential Lipid And Fatty Acid Profiles Of Photoautotrophic And Heterotrophic Chlorella Zofingiensis: Assessment Of Algal Oils For Biodiesel Production. Bioresource Technology. 102: P. 106-110.
74. Y.C. Sharma, B.S., S.N. Upadhyay, Advancements In Development And Characterization Of Biodiesel: A Review. Fuel, 2008. 87: P. 2355–2373.
75. A. Robles-Medina, P.A.G.-M., L. Esteban-Cerdán, E. Molina-Grima, Biocatalysis: Towards Ever Greener Biodiesel Production. Biotechnology Advances, 2009. 27: P. 398-408.
76. Frater, D., Kaloustian, J., Teixeira, C., Garcia, M, Biodiesel A Partir De Aceite De Algas, In Conferencia Monográfica Internacional. 23 De Enero Del 2008. 2008, Global Energy.
77. Belarbi H, M.E., Chisti Y., A Process For High And Scaleable Recovery Of High Purity Eicosapentaenoic Acid Esters From Microalgae And Fish Oil. Enzyme Microb Technol, 2000. 26: P. 16-29.
78. Bennett, G.F., S. Minteer, Editor, Alcoholic Fuels, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (2006) ISBN 0-8493-3944-8 295 Pp., Price: US$ 99.95. Journal Of Hazardous Materials, 2007. 147(1-2): P. 684-685.
79. Mata, T.M., Et Al., Environmental Analysis Of Gasoline Blending Components Through Their Life Cycle. Journal Of Cleaner Production, 2005. 13(5): P. 517-523.
80. Okamoto, K., Et Al., Direct Ethanol Production From Starch, Wheat Bran And Rice Straw By The White Rot Fungus Trametes Hirsuta. Enzyme And Microbial Technology. 48(3): P. 273-277.
81. Attavian, B.N., G.L. Floyd, And D.E. Fairbrothers, Fatty Acids Filamentous Green Algae. Biochemical Systematics And Ecology, 1977. 5(2): P. 65-69.
82. Cardozo, K.H.M., Et Al., Metabolites From Algae With Economical Impact. Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 146(1-2): P. 60-78.
83. Xiaoling Miao, Q.W., Biodiesel Production From Heterotrophic Microalgal Oil. Bioresource Technology, 2006. 97: P. 841–846.

84. Darnoko, D.C., M., Continuous Production Of Palm Methyl Esters. Journal Of The American Oil Chemists Society, 2000. 77. No 12: P. 1269-1272.
85. Halim, R., Et Al., Oil Extraction From Microalgae For Biodiesel Production. Bioresource Technology. In Press, Corrected Proof.
86. Jena, U., Et Al., Evaluation Of Microalgae Cultivation Using Recovered Aqueous Co-Product From Thermochemical Liquefaction Of Algal Biomass. Bioresource Technology. 102(3): P. 3380-3387.
87. Da Silva, T., C. Santos, And A. Reis, Multi-Parameter Flow Cytometry As A Tool To Monitor Heterotrophic Microalgal Batch Fermentations For Oil Production Towards Biodiesel. Biotechnology And Bioprocess Engineering, 2009. 14(3): P. 330-337.
88. Byung-Hwan Um, Y.-S.K., Review: A Chance For Korea To Advance Algal-Biodiesel Technology. Journal Of Industrial And Engineering Chemistry, 2009. 15: P. 1-7.
89. Kim, J.-D. And C.-G. Lee, Systemic Optimization Of Microalgae For Bioactive Compound Production. Biotechnology And Bioprocess Engineering, 2005. 10(5): P. 418-424.
90. Tran, H.-L., S.-J. Hong, And C.-G. Lee, Evaluation Of Extraction Methods For Recovery Of Fatty Acids From Botryococcus Braunii LB 572 And Synechocystis Sp. PCC 6803. Biotechnology And Bioprocess Engineering, 2009. 14(2): P. 187-192.
91. Knauer, J. And P.C. Southgate, Nutritional Value Of A Spray-Dried Freshwater Alga, Spongiococcum Excentricum, For Pacific Oyster (Crassostrea Gigas) Spat. Aquaculture, 1996. 146(1-2): P. 135-146.
92. Masojídek, J., Et Al., Mass Cultivation Of Freshwater Microalgae, In Encyclopedia Of Ecology. 2008, Academic Press: Oxford. P. 2226-2235.
93. Gradinger, R., Sea-Ice Algae: Major Contributors To Primary Production And Algal Biomass In The Chukchi And Beaufort Seas During May/June 2002. Deep Sea Research Part II: Topical Studies In Oceanography, 2009. 56(17): P. 1201-1212.
94. Görs, M., Et Al., Quality Analysis Of Commercial Chlorella Products Used As Dietary Supplement In Human Nutrition. Journal Of Applied Phycology. 22(3): P. 265-276.
95. Molina Grima, E., Et Al., Photobioreactors: Light Regime, Mass Transfer, And Scaleup. Journal Of Biotechnology, 1999. 70(1-3): P. 231-247.
96. E. Molina, J.F., F.G. Acien, Y. Chisti, Tubular Photobioreactor Design For Algal Cultures. Journal Of Biotechnology, 2001. 92: P. 113-131.
97. Ressler, D.K., Marine Products Of Commerce, In Reinbold Publishing Corporation. 1970: New York.
98. Orlando Jorquera, A.K., Emerson A. Sales, Marcelo Embiruçu, Maria L. Ghirardi, Comparative Energy Life-Cycle Analyses Of Microalgal Biomass Production In Open Ponds And Photobioreactors. Bioresource Technology, 2009. Accepted.
99. Teresa M. Mata, A.A.M., Nidia. S. Caetano, Microalgae For Biodiesel Production And Other Applications: A Review. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 2010. 14: P. 217-232.
100. Thomas, W.H., Et Al., Yields, Photosynthetic Efficiencies And Proximate Composition Of Dense Marine Microalgal Cultures. I. Introduction And Phaeodactylum Tricornutum Experiments. Biomass, 1984. 5(3): P. 181-209.

101. Guan, Y., Et Al., Two-Stage Photo-Biological Production Of Hydrogen By Marine Green Alga Platymonas Subcordiformis. Biochemical Engineering Journal, 2004. 19(1): P. 69-73.
102. Posten, I.P.N.A.C., Simulations Of Light Intensity Variation In Photobioreactors. Journal Of Biotechnology, 2007. 131: P. 276-285.
103. Michele Greque De Morais, J.A.V.C., Biofixation Of Carbon Dioxide By Spirulina Sp. And Scenedesmus Obliquus Cultivated In A Three-Stage Serial Tubular Photobioreactor. Journal Of Biotechnology, 2007. 129: P. 439-445.
104. A.S.Miron, Comparative Evaluation Of Compact Photobioreactors For Large - Scale Monoculture Of Microalgae. . Journal Of Biotechnology, 1999. 70: P. 249-270.
105. J. Pruvost., J.F.C., And J. Legrand Hydrodynamics Influence On Light Conversion In Photobioreactors: An Energetically Consistent Analysis Chemical Engineering Journal, 2008. 63: P. 3679 - 3694
106. Issarapayup, K., S. Powtongsook, And P. Pavasant, Flat Panel Airlift Photobioreactors For Cultivation Of Vegetative Cells Of Microalga Haematococcus Pluvialis. Journal Of Biotechnology, 2009. 142(3-4): P. 227-232.
107. Ai, W., Et Al., Development Of A Ground-Based Space Micro-Algae Photo-Bioreactor. Advances In Space Research, 2008. 41(5): P. 742-747.
108. Giner, J.-L., H. Zhao, And C. Tomas, Sterols And Fatty Acids Of Three Harmful Algae Previously Assigned As Chattonella. Phytochemistry, 2008. 69(11): P. 2167-2171.
109. Tang, Y., X. Ma, And Z. Lai, Thermogravimetric Analysis Of The Combustion Of Microalgae And Microalgae Blended With Waste In N2/O2 And CO2/O2 Atmospheres. Bioresource Technology. 102(2): P. 1879-1885.
110. S. Sawayama, T.M., S-Y. Yokoyama, Possibility Of Renewable Energy Production And CO_2 Mitigation By Thermochemical Liquefaction Of Microalgae. Biomass And Bioenergy, 1999. 17: P. 33-39.
111. Jin Liu, J.H., King Wai Fan, Yue Jiang, Yujuan Zhong, Zheng Sun, Feng Chen, Production Potential Of Chlorella Zofingienesis As A Feedstock For Biodiesel. Bioresource Technology, 2010. 101: P. 8658–8663.
112. Heredia-Arroyo, T., W. Wei, And B. Hu, Oil Accumulation Via Heterotrophic/Mixotrophic Chlorella Protothecoides. Applied Biochemistry And Biotechnology: P. 1-18.
113. Travieso, L., Et Al., Batch Mixed Culture Of Chlorella Vulgaris Using Settled And Diluted Piggery Waste. Ecological Engineering, 2006. 28(2): P. 158-165.
114. Kaewpintong, K., Et Al., Photoautotrophic High-Density Cultivation Of Vegetative Cells Of Haematococcus Pluvialis In Airlift Bioreactor. Bioresource Technology, 2007. 98(2): P. 288-295.
115. Papageorgiou, G., M. Tsimilli-Michael, And K. Stamatakis, The Fast And Slow Kinetics Of Chlorophyll Fluorescence Induction In Plants, Algae And Cyanobacteria: A Viewpoint. Photosynthesis Research, 2007. 94(2): P. 275-290.
116. Kulczycki, G.R., R.W. Virnstein, And W.G. Nelson, The Relationship Between Fish Abundance And Algal Biomass In A Seagrass-Drift Algae Community. Estuarine, Coastal And Shelf Science, 1981. 12(3): P. 341-347.
117. Goffaux, G., A. Vande Wouwer, And O. Bernard, Improving Continuous-Discrete Interval Observers With Application To Microalgae-Based Bioprocesses. Journal Of Process Control, 2009. 19(7): P. 1182-1190.

118. Acién Fernández, F.G., Et Al., Outdoor Production Of Phaeodactylum Tricornutum Biomass In A Helical Reactor. Journal Of Biotechnology, 2003. 103(2): P. 137-152.
119. Michels, M., Et Al., Effects Of Shear Stress On The Microalgae Chaetoceros Muelleri. Bioprocess And Biosystems Engineering: P. 1-7.
120. C.U. Ugwu, H.A., H. Uchiyama, Photobioreactors For Mass Cultivation Of Algae. Bioresource Technology, 2008. 99: P. 4021-4028.
121. Skjånes, K., Et Al., H2 Production From Marine And Freshwater Species Of Green Algae During Sulfur Deprivation And Considerations For Bioreactor Design. International Journal Of Hydrogen Energy, 2008. 33(2): P. 511-521.
122. S.A Markov., M.J.B., And D.O. Hall Hydrogen Photoproduction And Carbon Dioxide Uptake By Inmobilized Anabaena Variabilis In A Hollow - Fiber Photobiorreactor Enzyme And Microbial Technology 1995. 17: P. 306-310.
123. Maria J. Barbosa, J.H., Rene´ H. Wijffels, Optimisation Of Cultivation Parameters In Photobioreactors For Microalgae Cultivation Using The A-Stat Technique. Biomolecular Engineering, 2003. 20: P. 115-123.
124. Li-Hai Fan, Y.-T.Z., Lin Zhang, Huan-Lin Chen, Evaluation Of A Membrane-Sparged Helical Tubular Photobioreactor For Carbon Dioxide Biofixation By Chlorella Vulgaris. Journal Of Membrane Science, 2008. 325: P. 336-345.
125. Packer, M., Algal Capture Of Carbon Dioxide; Biomass Generation As A Tool For Greenhouse Gas Mitigation With Reference To New Zealand Energy Trategy And Policy Energy Policy, 2009. 37: P. 3428-3437.
126. Halim, R., Et Al., Oil Extraction From Microalgae For Biodiesel Production. Bioresource Technology. 102(1): P. 178-185.
127. Cornieri, F.Y.D.F., Walter, Un Procedimiento Para La Extraccion Del Ester Etilico Del Acido Docosahexenoico A Partir De Aceites De Pescado Y Composiciones Farmaceuticas Y/O Dieteticas Que Contienen Una Mezcla De Esteres Etilicos Del Acido Docosahexenoico Y Eicosapentenoico. Oficina Española De Patentes Y Marcas., 1994.
128. Jae-Yon Lee, C.Y., So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh, Comparison Of Several Methods For Effective Lipid Extraction From Microalgae. Bioresource Technology, 2010. 101: P. S75-S77.
129. Fernandez, C., Algas De Galicia. 2000, Centro De Espectrometría Atómica UCM.: Universidad De Madrid.
130. Pfromm, P.H., V. Amanor-Boadu, And R. Nelson, Sustainability Of Algae Derived Biodiesel: A Mass Balance Approach. Bioresource Technology. In Press, Corrected Proof.
131. Shirai, F., Et Al., Cultivation Of Microalgae In The Solution From The Desalting Process Of Soy Sauce Waste Treatment And Utilization Of The Algal Biomass For Ethanol Fermentation. World Journal Of Microbiology And Biotechnology, 1998. 14(6): P. 839-842.
132. Prakash, S., S.L. Sasikala, And V.H.J. Aldous, Isolation And Identification Of Mycobacterium Tuberculosis And Screening Of Partially Characterised Antimycobacterial Compounds From Chosen Marine Micro Algae. Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine. 3(8): P. 655-661.
133. Merin, D.D., S. Prakash, And B.V. Bhimba, Antibacterial Screening Of Silver Nanoparticles Synthesized By Marine Micro Algae. Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine. 3(10): P. 797-799.

134. Desmorieux, H., Et Al., Effects Of Size And Form Of Arthrospira Spirulina Biomass On The Shrinkage And Porosity During Drying. Journal Of Food Engineering. 100(4): P. 585-595.
135. Desmorieux, H.L.N. And N.G. Decaen, Convective Drying Of Spirulina In Thin Layer. Journal Of Food Engineering, 2005. 66(4): P. 497-503.
136. Dissa, A.O., Et Al., Shrinkage, Porosity And Density Behaviour During Convective Drying Of Spirulina. Journal Of Food Engineering. 97(3): P. 410-418.
137. Desmorieux, H.L.N. And N.G. Decaen, Withdrawn: Convective Drying Of Spirulina In Thin Layer. Journal Of Food Engineering, 2006. 77(1): P. 64-70.
138. Herrero, M., A. Cifuentes, And E. Ibañez, Sub- And Supercritical Fluid Extraction Of Functional Ingredients From Different Natural Sources: Plants, Food-By-Products, Algae And Microalgae: A Review. Food Chemistry, 2006. 98(1): P. 136-148.
139. Rubio, R., M.J. Ruiz-Chancho, And J.F. LÃ³Pez-SÃ¡Nchez, Sample Pre-Treatment And Extraction Methods That Are Crucial To Arsenic Speciation In Algae And Aquatic Plants. Trac Trends In Analytical Chemistry. 29(1): P. 53-69.
140. Hattab, M.E., Et Al., Comparison Of Various Extraction Methods For Identification And Determination Of Volatile Metabolites From The Brown Alga Dictyopteris Membranacea. Journal Of Chromatography A, 2007. 1143(1-2): P. 1-7.
141. García Salgado, S., M.A. Quijano Nieto, And M.M. Bonilla Simón, Determination Of Soluble Toxic Arsenic Species In Alga Samples By Microwave-Assisted Extraction And High Performance Liquid Chromatography Hydride Generation Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. Journal Of Chromatography A, 2006. 1129(1): P. 54-60.
142. Alves, A., Et Al., Extraction And Physico-Chemical Characterization Of A Versatile Biodegradable Polysaccharide Obtained From Green Algae. Carbohydrate Research. 345(15): P. 2194-2200.
143. Dubinsky, Z. And S. Aaronson, Increase Of Lipid Yields From Some Algae By Acid Extraction. Phytochemistry, 1979. 18(1): P. 51-52.
144. Da Cunha, M.E., Et Al, Beef Tallow Biodiesel Produced In A Pilot Scale. Fuel Processing Technology, 2009. 90(4): P. 570-575.
145. Guanhua Huang, F.C., Dong Wei, Xuewu Zhang, Gu Chen, Biodiesel Production By Microalgal Biotechnology. Applied Energy, 2010. 87: P. 38-46.
146. Singh, J. And S. Gu, Commercialization Potential Of Microalgae For Biofuels Production. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 2009. 14(9): P. 2596-2610.
147. Mustafa, B., Production Of Bioethanol From Lignocellulosic Materials Via The Biochemical Pathway: A Review. Energy Conversion And Management, 2011. 52(2): P. 858-875.
148. E.E. Powell, G.A.H., Economic Assessment Of An Integrated Bioethanol–Biodiesel–Microbial Fuel Cell Facility Utilizing Yeast And Photosynthetic Algae. Chemical Engineering Research And Design, 2009. 87: P. 1340-1348.
149. Syred, N., Et Al., Investigations Of Institute For Engineering Thermophysics (Thermogasdynamics Department) In The Area Of Combustion And Gasification Of Alternative Fuels, In Advanced Combustion And Aerothermal Technologies. 2007, Springer Netherlands. P. 231-245.
150. Balat, M., Et Al., Main Routes For The Thermo-Conversion Of Biomass Into Fuels And Chemicals. Part 2: Gasification Systems. Energy Conversion And Management, 2009. 50(12): P. 3158-3168.

151. Brown, D., Et Al., Thermo-Economic Analysis For The Optimal Conceptual Design Of Biomass Gasification Energy Conversion Systems. Applied Thermal Engineering, 2009. 29(11-12): P. 2137-2152.
152. Amin, S., Review On Biofuel Oil And Gas Production Processes From Microalgae. Energy Conversion And Management, 2009. 50(7): P. 1834-1840.
153. Felipe A. Perdomo, A.G.-V., Molecular Thermodynamics Of Biodiesel Fuel Compounds. Fluid Phase Equilibria, 2010. 293: P. 182-189.
154. Hsueh, H.T., H. Chu, And S.T. Yu, A Batch Study On The Bio-Fixation Of Carbon Dioxide In The Absorbed Solution From A Chemical Wet Scrubber By Hot Spring And Marine Algae. Chemosphere, 2007. 66(5): P. 878-886.
155. Hirano, A., Et Al., CO2 Fixation And Ethanol Production With Microalgal Photosynthesis And Intracellular Anaerobic Fermentation. Energy. 22(2-3): P. 137-142.
156. Arauzo, M., Et Al., The Role Of Algae In A Deep Wastewater Self-Regeneration Pond. Water Research, 2000. 34(14): P. 3666-3674.
157. Lewis M, B., Uptake Of Carbon Dioxide From Flue Gas By Microalgae. Energy Conversion And Management. 37(6-8): P. 1363-1367.
158. Nakayama, T., Et Al., The Basal Position Of Scaly Green Flagellates Among The Green Algae (Chlorophyta) Is Revealed By Analyses Of Nuclear-Encoded SSU Rrna Sequences. Protist, 1998. 149(4): P. 367-380.
159. De Reviers, B. And A. Leproux, Characterization Of Polysaccharides From Enteromorpha Intestinalis (L.) Link, Chlorophyta. Carbohydrate Polymers, 1993. 22(4): P. 253-259.
160. Coppejans, E., Et Al., Marine Green Algae (Chlorophyta) From The North Coast Of Papua New Guinea. Cryptogamie Algologie, 2001. 22(4): P. 375-443.
161. Fatih Demirbas, M., M. Balat, And H. Balat, Biowastes-To-Biofuels. Energy Conversion And Management, 2011. 52(4): P. 1815-1828.
162. Spolaore, P., Et Al., Commercial Applications Of Microalgae. Journal Of Bioscience And Bioengineering, 2006. 101(2): P. 87-96.
163. De La Noue, J. And N. De Pauw, The Potential Of Microalgal Biotechnology: A Review Of Production And Uses Of Microalgae. Biotechnology Advances, 1988. 6(4): P. 725-770.
164. Azma, M., Et Al., Improvement Of Medium Composition For Heterotrophic Cultivation Of Green Microalgae, Tetraselmis Suecica, Using Response Surface Methodology. Biochemical Engineering Journal. 53(2): P. 187-195.
165. Ahmad, A.L., Et Al., Optimization Of Microalgae Coagulation Process Using Chitosan. Chemical Engineering Journal. 173(3): P. 879-882.
166. Ahmad, A.L., Et Al., Microalgae As A Sustainable Energy Source For Biodiesel Production: A Review. Renewable And Sustainable Energy Reviews. 15(1): P. 584-593.
167. Arnaud, M.-F., Growth As A Function Of Rationing: A Model Applicable To Fish And Microalgae. Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology, 1999. 236(1): P. 1-13.
168. Martã-Nez-Fernã¡Ndez, E. And P.C. Southgate, Use Of Tropical Microalgae As Food For Larvae Of The Black-Lip Pearl Oyster Pinctada Margaritifera. Aquaculture, 2007. 263(1-4): P. 220-226.
169. Singh, J. And S. Gu, Commercialization Potential Of Microalgae For Biofuels Production. Renewable And Sustainable Energy Reviews. 14(9): P. 2596-2610.

170. VÃ-Lchez, C., Et Al., Microalgae-Mediated Chemicals Production And Wastes Removal. Enzyme And Microbial Technology, 1997. 20(8): P. 562-572.
171. Chisti, Y., Biofuels From Microalgae. Biotechnology Advances, 2007. 25: P. 294-306.
172. El Gamal, A.A., Biological Importance Of Marine Algae. Saudi Pharmaceutical Journal. 18(1): P. 1-25.
173. Pruvost, J., Et Al., Systematic Investigation Of Biomass And Lipid Productivity By Microalgae In Photobioreactors For Biodiesel Application. Bioresource Technology. 102(1): P. 150-158.
174. Li, X., Et Al., Fatty Acids Of Some Algae From The Bohai Sea. Phytochemistry, 2002. 59(2): P. 157-161.
175. Stefanov, K., Et Al., Fatty Acid Composition Of Some Algae From The Black Sea. Phytochemistry, 1988. 27(11): P. 3495-3497.
176. Fuentes-Grünewald, C., Et Al., Use Of The Dinoflagellate Karlodinium Veneficum As A Sustainable Source Of Biodiesel Production. Journal Of Industrial Microbiology &Amp; Biotechnology, 2009. 36(9): P. 1215-1224.
177. Jorge Marrero, R.G., Group-Contribution Based Estimation Of Pure Component Properties. Fluid Phase Equilibria, 2001. 183-184: P. 183-208.
178. Biller, P. And A.B. Ross, Potential Yields And Properties Of Oil From The Hydrothermal Liquefaction Of Microalgae With Different Biochemical Content. Bioresource Technology. 102(1): P. 215-225.
179. De Waart, J., Et Al., Characterization Of Algae By Pyrolysis--Direct Chemical Ionization (Tandem) Mass Spectrometry. Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis, 1991. 18(3-4): P. 245-260.
180. Xiaoling Miao, Q.W., High Yield Bio-Oil Production From Fast Pyrolysis By Metabolic Controlling Of Chlorella Protothecoides. Journal Of Biotechnology, 2004. 110: P. 85-93.
181. Peng, W., Q. Wu, And P. Tu, Effects Of Temperature And Holding Time On Production Of Renewable Fuels From Pyrolysis Of Chlorella Protothecoides. Journal Of Applied Phycology, 2000. 12(2): P. 147-152.
182. Peng, W., Q. Wu, And P. Tu, Pyrolytic Characteristics Of Heterotrophic Chlorella Protothecoides For Renewable Bio-Fuel Production. Journal Of Applied Phycology, 2001. 13(1): P. 5-12.
183. Kirkels, A.F. And G.P.J. Verbong, Biomass Gasification: Still Promising? A 30-Year Global Overview. Renewable And Sustainable Energy Reviews. 15(1): P. 471-481.
184. Puig-Arnavat, M., J.C. Bruno, And A. Coronas, Review And Analysis Of Biomass Gasification Models. Renewable And Sustainable Energy Reviews. 14(9): P. 2841-2851.
185. Hirano, A., Et Al., Temperature Effect On Continuous Gasification Of Microalgal Biomass: Theoretical Yield Of Methanol Production And Its Energy Balance. Catalysis Today, 1998. 45(1-4): P. 399-404.
186. Pedro A. Rodriguez, G.L., Aldo Ometto, Lourdes M. Zumalacarregui, Osney Perez Potencialidades De Generación De Eletricidad A Partir De Biomasa. Scientia Et Technica Año Xvi,, 2010. 45(Issn 0122-1701): P. 267-271.
187. Alauddin, Z.A.B.Z., Et Al., Gasification Of Lignocellulosic Biomass In Fluidized Beds For Renewable Energy Development: A Review. Renewable And Sustainable Energy Reviews. 14(9): P. 2852-2862.

188. Agustin Valverde, B.S., Jose P. Montenegro, Análisis Comparativo De Las Características Fisicoquímicas De La Cascarilla De Arroz. Scientia Et Technica Año XIII, 2007. 37: P. 255-261.
189. V. Mahalec, M.E.-H., P. Medellin, G. Pokoo-Akins, Y.L. Maldonado And A. Nadim, Design Challenge-Towards Zero Emissions Fossil Fuel Power Plants. Design For Energy And The Environment, 2010. 7: P. 497-504.
190. Wu, X. And J.C. Merchuk, A Model Integrating Fluid Dynamics In Photosynthesis And Photoinhibition Processes. Chemical Engineering Science, 2001. 56(11): P. 3527-3538.
191. Wu, X. And J.C. Merchuk, Simulation Of Algae Growth In A Bench Scale Internal Loop Airlift Reactor. Chemical Engineering Science, 2004. 59(14): P. 2899-2912.
192. Hoh, R., Malaysia Biofuels Annual Report 2010, In USDA Foreign Agricultural Service: Kuala Lumpur., G.A.I. Network, Editor. 2010: Kuala Lumpur.
193. Sysaneth, S.A.L.D., Impacts Of Jatropha Plantation On Smallholders, In National Agriculture And Forestry Research Institute, T.S.M.R. Network, Editor. 2009.
194. Lardon, L., Et Al., Life-Cycle Assessment Of Biodiesel Production From Microalgae. Environmental Science & Technology, 2009. 43(17): P. 6475-6481.
195. Phan, A.N.A.T.M.P., Biodiesel Production From Waste Cooking Oils. Fuel, 2008. 87: P. 3490-3496.
196. Ma, F., L.D. Clements, And M.A. Hanna, Biodiesel Fuel From Animal Fat. Ancillary Studies On Transesterification Of Beef Tallow. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1998. 37(9): P. 3768-3771.
197. Uddin, S.N.A.L.B., Biomass-Fired Cogeneration Systems With CO2 Capture And Storage. Renewable Energy, 2007. 32(6): P. 1006-1019.
198. Liu*, A.-F.C.A.Y.A., Integrated Process Modeling And Product Design Of Biodiesel Manufacturing. Ind. Eng. Chem, 2010. 49: P. 1197-1213.
199. Granjo, J.F.O., B.P.D. Duarte, And N.M.C. Oliveira, Kinetic Models For The Homogeneous Alkaline And Acid Catalysis In Biodiesel Production, In Computer Aided Chemical Engineering. Elsevier, 2009: P. 483-488.
200. Young, D., R. Scharp, And H. Cabezas, The Waste Reduction (WAR) Algorithm: Environmental Impacts, Energy Consumption, And Engineering Economics. Waste Management, 2000. 20(8): P. 605-615.
201. Zhang, Y., Et Al., Biodiesel Production From Waste Cooking Oil: 1. Process Design And Technological Assessment. Bioresource Technology, 2003. 89(1): P. 1-16.
202. Alexander Dimitrov Kroumov, Maicon C. De Araujo Tait, Development Of New Unstructured Model For Simultaneous Saccharification And Fermentation Of Starch To Ethanol By Recombinant Strain. Biochemical Engineering Journal 2006. 28: P. 243-255.
203. Quintero, J.A.M., M. I. Sánchez, O. J. Giraldo, O. H. Cardona, C. A., Fuel Ethanol Production From Sugarcane And Corn: Comparative Analysis For A Colombian Case. Energy, 2008. 33(3): P. 385-399.