



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN 1.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“DESARROLLO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL
A PARTIR DE UNA RUTA ESTRICTAMENTE BIOLÓGICA”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

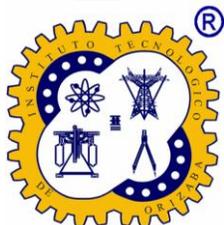
M. C. NAYELI GUTIÉRREZ CASIANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO HERNÁNDEZ AGUILAR





Orizaba, Veracruz, 02/02/2023
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación
Asunto: Autorización de Impresión
OPCION: I

C. NAYELI GUTIÉRREZ CASIANO
Candidato a Grado de Doctor en:
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

“DESARROLLO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE UNA RUTA ESTRICTAMENTE BIOLÓGICA”

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

Cuauhtémoc Sánchez R.

DR. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Orizaba, Veracruz, **Febrero 01, de 2023.**
Asunto: **Revisión de trabajo escrito**

C. CUAUHEMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

NAYELI GUTIÉRREZ CASIANO

La cual lleva el título de:

**DESARROLLO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE UNA RUTA
ESTRICTAMENTE BIOLÓGICA.**

Y concluyen que se acepta.

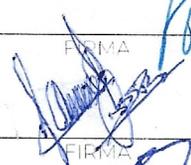
ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURAS®

PRESIDENTE	DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS
SECRETARIO	DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN
VOCAL	DR. GUILLERMO CORTES ROBLES
VOCAL	DR. ALBERTO ALFONSO AGUILAR LASSERPE
VOCAL	DR. ALBINO MARTÍNEZ SIBAÑA
VOCAL SUP.	DR. EDUARDO HERNÁNDEZ AGUILAR


FIRMA


FIRMA


FIRMA


FIRMA


FIRMA


FIRMA

TA-09-18



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 02 del mes de febrero del año 2023

La que suscribe

C. Nayeli Gutiérrez Casiano

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 143 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

**“DESARROLLO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE UNA RUTA
ESTRICTAMENTE BIOLÓGICA”**

del programa: Doctorado en Ciencias de la Ingeniería bajo la asesoría y dirección del Dr. Juan Manuel Méndez Contreras y el Dr. Eduardo Hernández Aguilar y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba. También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.


Nayeli Gutiérrez Casiano

Nombre y firma

Contenido

RESUMEN	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS	22
CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO.....	22
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	24
1.1. Biodiesel	24
1.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	26
1.2.1. Reproducción	27
1.2.2. Composición primaria.....	27
1.3 Modelo de crecimiento cinético de microalgas	28
1.3.1 Modelo logístico.....	28
1.3.2. Modelo Gompertz	28
CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE.....	29
2.1 Proceso de producción de biodiésel.....	29
2.2 Producción de biodiesel a partir de microalgas	32
2.2.1 Cultivo de microalgas.....	34
2.2.2 Cosecha de biomasa	35
2.2.3. Extracción de lípidos.....	36
2.2.4. Transesterificación	37

2.3 Comportamiento reológico de la producción de biodiesel con microalgas	39
2.4 Biocatalizador para la producción de biodiesel	40
2.4.1. La lipasa <i>B Acrílica cándida antártica</i> como biocatalizador en la producción de biodiesel.	41
2.5 Comportamiento reológico del biodiésel	42
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	43
3.1 Obtención de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en medio de cultivo <i>Bold Basal</i>	44
3.1.1 Cultivo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en medio <i>Bold Basal (MBB)</i>	44
3.1.2 Medición de la tasa de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	46
3.1.3 Determinación de la biomasa	47
3.1.4 Evaluación de densidad relativa.....	47
3.1.5 Evaluación de pigmentos	48
3.1.6 Evaluación de proteínas	48
3.1.7 Evaluación de contenido lipídico	49
3.1.8 Evaluación de contenido de carbohidratos.....	50
3.2 Obtención de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola (ARIA)	50
3.2.1. Caracterización del agua residual avícola	51
3.2.2. Cultivo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual avícola	53
3.3. Medición de las propiedades reológicas en la suspensión de microalgas.....	54
3.3.1. Fotobiorreactor para la producción de biomasa	54
3.3.2. Determinación de número de Reynolds y tamaño de burbuja	55
3.3.3 Recolección de biomasa de microalgas.....	56
3.3.4. Disrupción celular por ultrasonido.....	56
3.3.5. Extracción de lípidos de microalgas con solventes.....	57
3.3.6. Extracción de lípidos de microalgas con solventes.....	57

3.3.7. Caracterización de lípidos	57
3.4 Producción de biodiesel mediante transesterificación enzimática.....	58
3.4.1 Obtención de ésteres metílicos por transesterificación enzimática.....	59
3.4.2 Recuperación de la enzima.....	59
3.4.3 Lavado del biodiesel.....	60
3.4.4 Determinación de la calidad del biodiesel.....	60
3.4.5 Medición de las propiedades reológicas.....	61
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	62
4.1 Evaluación de la densidad celular de <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.....	62
4.2. Evaluación de la producción de biomasa por peso seco de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.....	64
4.3 Análisis del comportamiento de la temperatura y pH durante la cinética de crecimiento en MBB.....	65
4.4 Evaluación del efecto de la luz y aire en la producción de proteínas en MBB.....	65
4.5 Análisis de la producción de carbohidratos en MBB.....	66
4.6 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos en MBB	67
4.6.1 Evaluación de la clorofila <i>a</i> en microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.....	67
4.6.2. Evaluación de la clorofila <i>b</i> en microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.....	68
4.6.3. Evaluación de carotenos en microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.....	69
4.7 Evaluación del efecto de intensidad de luz y de aire en los lípidos producidos por la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.	70
4.8 Evaluación de las características fisicoquímicas del agua residual de una industria avícola.....	71
4.9 Resultados obtenidos en la fase de adaptación de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> a agua residual de una industria avícola	73

4.10 Evaluación de la densidad celular de <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola.....	74
4.11 Comportamiento del contenido de nitritos durante el tratamiento con <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola	78
4.12 Comportamiento del contenido de fósforo total durante el tratamiento con <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola	80
4.13 Evaluación de biomasa por peso seco de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola.....	80
4.14 Evaluación del efecto de luz y DQO en la producción de proteínas microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola.....	81
4.15 Evaluación del efecto de luz y DQO en la producción de carbohidratos de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de una industria avícola.....	83
4.16 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos en agua residual de una industria avícola.....	84
4.16.1 Evaluación de la clorofila <i>a</i> en microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual industrial avícola	84
4.16.2 Evaluación de la clorofila <i>b</i> en microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual industrial avícola	86
4.17 Evaluación del efecto de intensidad de luz y DQO en la producción de lípidos en la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> con agua residual avícola.....	87
4.18 Implementación de un fotobiorreactor Applikon para el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con MBB.....	88
4.18.1 Evaluación de la densidad celular con MBB	88
4.18.2 Evaluación de la producción de biomasa por peso seco	89
4.18.3 Producción de proteínas	91
4.18.4 Producción de carbohidratos	91
4.18.5 Producción de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y clorofilas totales.....	91

4.18.6 Producción de lípidos	92
4.18.7 Evaluación de las propiedades reológicas	92
4.19 Implementación de un fotobiorreactor Applikon para el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con ARIA	94
4.19.1 Crecimiento celular y DQO en un fotobiorreactor Applikon.....	94
4.19.2 Comportamiento de nitritos, oxígeno disuelto y pH en un fotobiorreactor Applikon.....	96
4.19.3 Evaluación del desempeño de la biomasa por peso seco en un fotobiorreactor Applikon.....	97
4.19.4 Evaluación del desempeño en la producción de proteínas en un fotobiorreactor Applikon.....	97
4.19.5 Evaluación del desempeño en la producción de carbohidratos en un fotobiorreactor Applikon.....	98
4.19.6 Evaluación del desempeño de lípidos en un fotobiorreactor Applikon	98
4.19.7 Evaluación del desempeño de pigmentos en un fotobiorreactor Applikon.....	98
4.19.8 Comportamiento de la densidad relativa.....	98
4.19.9 Comportamiento de la temperatura en fotobiorreactor Applikon	99
4.19.10 Evaluación de la turbidez en fotobiorreactor Applikon	100
4.19.11 Evaluación de Sólidos totales, suspendidos y volátiles	101
4.19.12 Propiedades reológicas	102
4.20 Caracterización de los lípidos extraídos de microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	106
4.20.1 Evaluación del índice de saponificación en los lípidos extraídos	106
4.20.2 Evaluación del índice de acidez en los lípidos extraídos.	106
4.20.3 Evaluación de la densidad relativa en los lípidos extraídos	107
4.20.4 Evaluación de humedad en los lípidos extraídos de <i>Chlorella vulgaris</i>	107
4.20.5 Evaluación del índice de refracción en los lípidos extraídos.	108

4.21 Evaluación de la calidad y rendimiento del biodiesel obtenido por transesterificación enzimática con lípidos de microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	108
4.21.1 Evaluación de la viscosidad del biodiesel obtenido por ruta biológica.....	110
4.21.2 Evaluación del número de ácido del biodiesel obtenido por ruta biológica.....	112
4.21.3 Evaluación de la densidad del biodiesel obtenido por ruta biológica	114
4.21.4 Evaluación del punto de nube del biodiesel obtenido por ruta biológica.....	115
4.21.5 Evaluación del índice de refracción del biodiesel obtenido por ruta biológica	117
4.21.6 Evaluación de la corrosividad al cobre del biodiesel obtenido por ruta biológica	119
4.21.7 Evaluación al punto de inflamación del biodiesel obtenido por ruta biológica	119
4.21.8 Evaluación del residuo de carbono del biodiesel obtenido por ruta biológica.	121
4.21.9 Reología del biodiesel obtenido por ruta biológica.....	122
CONCLUSIONES.....	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
PRODUCTOS ACADÉMICOS	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fases de formación de la pared celular hija en <i>Chlorella vulgaris</i> (Safi, et al., 2014)	27
Figura 2 Etapas de producción de biodiesel a partir de microalgas (Arias Peñaranda, et al., 2013)	34
Figura 3 Tipos de métodos de cosecha de microalgas (Fazal, et al., 2017)	36
Figura 4 Modelos reológicos independientes del tiempo	40
Figura 5 Metodología para la obtención de biodiesel a través de procesos biológicos	43
Figura 6 Hemocitómetro o cámara de Neubauer para el conteo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	46
Figura 7. Punto de muestreo en industria avícola	51
Figura 8. (a) Fotobiorreactor, (b) Dimensiones y geometría del interior, (c) geometría del interior, (d) fotobiorreactor con chaqueta de enfriamiento, y (e) fotobiorreactor con sensores.	55
Figura 9 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para densidad celular y b) gráfica de efectos principales para densidad celular	62
Figura 10 Gráfica de interacciones para densidad celular de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB	63
Figura 11 Gráfica línea ajustada Modelo de Gompertz y logístico para crecimiento de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.	63
Figura 12 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para biomasa y gráfica de efectos principales para biomasa en MBB	64
Figura 13 Gráfica de interacciones para biomasa en MBB	64
Figura 14 Gráfica de efectos principales para proteínas en MBB	65
Figura 15 Gráfica de superficie para la producción de proteínas en MBB	66
Figura 16 a) Gráfica de Pareto de efectos estandarizados para carbohidratos y b) gráfica de efectos principales para carbohidratos en MBB.	66
Figura 17 Gráfica de superficie para la producción de carbohidratos en MBB	67
Figura 18 Gráfica de efectos principales para clorofila <i>a</i> en MBB	68
Figura 19 Gráfica de superficie para la producción de clorofila <i>a</i> en MBB	68
Figura 20 Gráfica de efectos principales para clorofila <i>b</i> en MBB	69

Figura 21 Gráfica de superficie para la producción de clorofila <i>b</i> en MBB	69
Figura 22 a) Gráfica de Pareto de efectos estandarizados para carotenos y b) gráfica de efectos principales para carotenos en MBB.....	70
Figura 23 Gráfica de superficie para la producción de carotenos en MBB.....	70
Figura 24 Gráfica de efectos principales para lípidos en MBB.....	71
Figura 25 Gráfica de superficie para la producción de lípidos en MBB	71
Figura 26 Cinética de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en adaptación.....	73
Figura 27 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y b) gráfica de efectos principales para densidad celular con Agua Residual de la Industria Avícola (ARIA).....	74
Figura 28 Gráfica de interacciones de crecimiento celular de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en ARIA	75
Figura 29 Curva de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> con las condiciones de 12000 lux y 100% DQO (1261.85 ± 426.061 mg/L).....	76
Figura 30 Gráfica línea ajustada modelo de Gompertz y logístico para crecimiento de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en ARIA a 12000 lux y DQO de 1261.85±426.061 mg/L. ...	78
Figura 31 Relación entre el comportamiento de la DQO y crecimiento celular con la producción de oxígeno disuelto y de nitritos en la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual avícola.....	79
Figura 32 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y gráfica de efectos principales para la producción de biomasa	80
Figura 33 Gráfica de interacción para la producción de biomasa (mg/L)	81
Figura 34 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para proteínas y b) gráfica de efectos principales para proteínas en agua residual industrial avícola	82
Figura 35 Gráfica de superficie para la producción de proteínas en agua residual de una industria avícola.....	83
Figura 36 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para carbohidratos y b) gráfica de efectos principales para carbohidratos en agua residual industrial avícola	83
Figura 37 a) Gráfica de interacción y b) gráfico de superficie para la producción de carbohidratos en agua residual industrial avícola.....	84
Figura 38 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y gráfica de efectos principales para la producción de clorofila <i>a</i> en agua residual de una industria avícola.....	85

Figura 39 Gráfica de interacciones para la producción de Clorofila a	85
Figura 40 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y b) gráfica de efectos principales para la producción de clorofila <i>b</i>	86
Figura 41 Gráfica de interacción para la producción de clorofila <i>b</i>	87
Figura 42 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y b) gráfica de efectos principales para la generación de lípidos con <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual avícola	87
Figura 43 Gráfica de interacción para la producción de lípidos y gráfico de superficie	88
Figura 44 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en fotobiorreactor Applikon con iluminación de 12000 lux y flujo de aire de 4.8 L/min	89
Figura 45 a) Gráfica línea ajustada modelo de Gompertz y b) modelo logístico para crecimiento de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> con MBB en fotobiorreactor Applikon.....	89
Figura 46 Producción de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> con MBB en un fotobiorreactor Applikon	90
Figura 47 Cinética del comportamiento del pH en el fotobiorreactor Applikon.....	91
Figura 48 Comportamiento reológico de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en MBB.....	92
Figura 49 Crecimiento celular y DQO en un fotobiorreactor Applikon en las condiciones de 12000 lux y DQO inicial de 784.3 mg/L.....	95
Figura 50 a) Gráfica línea ajustada modelo de Gompertz y b) modelo logístico para crecimiento de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> con ARIA en un fotobiorreactor Applikon...	96
Figura 51 Comportamiento de nitritos, oxígeno disuelto y pH	96
Figura 52 Evaluación de la biomasa por peso seco en un fotobiorreactor Applikon	97
Figura 53 Comportamiento de la densidad relativa en un fotobiorreactor Applikon.....	99
Figura 54 Comportamiento de la temperatura.....	100
Figura 55 Evaluación de turbidez en un fotobiorreactor Applikon	101
Figura 56 Evaluación de sólidos totales, sólidos suspendidos y sólidos totales volátiles..	101
Figura 57 Comportamiento reológico de la microalga en ARIA	102
Figura 58 Número de Reynolds, densidad relativa durante la cinética de crecimiento en ARIA	103
Figura 59 Rendimiento de la conversión de lípidos a biodiesel a diferentes temperaturas y relaciones molares	109

Figura 60 Rendimiento de la conversión de lípidos a diferentes % de enzima y relaciones molares	110
Figura 61 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados b) Gráfica de superficie para viscosidad del biodiesel con respecto a la temperatura de reacción y la relación molar lípidos:alcohol	111
Figura 62 a) Diagrama de Pareto b) Diagrama de efectos principales para viscosidad cinemática con diferentes concentraciones de enzima y relaciones molares	112
Figura 63 a) Diagrama de Pareto b) Grafica de optimización de respuesta de la mejor temperatura y relación molar para un número de ácido bajo	113
Figura 64 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el número de ácido con valores de % en peso de enzima y relaciones molares lípidos:alcohol	113
Figura 65 a) Gráfica de superficie b) Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de la temperatura y la relación molar lípidos:alcohol en la densidad del biodiesel	114
Figura 66 a) Diagrama de Pareto, b) Diagrama de efectos principales para densidad con diferentes % de enzima en peso y diferentes relaciones molares	115
Figura 67 a) Diagrama de Pareto, b) Gráfica de efectos principales para el punto de nube con diferentes temperaturas de reacción y relaciones molares lípidos:alcohol.....	116
Figura 68 a) Diagrama de Pareto, b) Gráfica de efectos principales para el punto de nube con diferentes % de enzima y relación molar lípidos:alcohol.....	117
Figura 69 Gráfica de superficie para el índice de refracción a diferentes temperaturas de reacción y diferentes relaciones molares de lípidos:alcohol	118
Figura 70 Diagrama de Pareto para índice de refracción con los factores % de enzima y relación molar	118
Figura 71 a) Diagrama de Pareto b) Gráfica de superficie para punto de inflamación a diferentes temperaturas y relaciones molares lípidos:alcohol	120
Figura 72 Diagrama de Pareto para el punto de inflamación con los factores porcentaje en peso de enzima y relaciones molares.....	120
Figura 73 Gráfica de superficie para el % de residuos de carbono a diferentes temperaturas y relaciones molares de lípidos:alcohol.....	121
Figura 74 a) Diagrama de Pareto b) Diagrama de efectos principales para residuos de carbono con los factores concentración de enzima y relación molar lípidos:alcohol	122

Figura 75 Reograma de la viscosidad experimental de la reacción de transesterificación a diferentes temperaturas y relaciones molares 123

Figura 76 Reograma de la viscosidad experimental de la reacción de transesterificación a diferentes % en peso de enzima y relaciones molares lípidos:alcohol 125

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades físicas del biodiesel (Yusuf, et al., 2011).....	24
Tabla 2 Viscosidad cinemática en estándares de combustible diésel (Knothe & Steidley, 2005).....	25
Tabla 3 Clasificación científica de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	26
Tabla 4 Métodos para la producción de biodiesel (Dennis, et al., 2010)	31
Tabla 5 Promedio de contenido de lípidos (% peso seco) de algunas microalgas (Griffiths & Harrison, 2009).....	33
Tabla 6 Soluciones para medio Bold Basal (MBB) (Daneshvar , et al., 2018).....	44
Tabla 7 Preparación de solución de metales traza.....	45
Tabla 8 Diseño de experimentos 3 ² para determinación de las condiciones de aire y luz para el crecimiento de la <i>Chlorella vulgaris</i> en medio sintético.....	45
Tabla 9 Normas Mexicanas empleadas para la caracterización del agua residual avícola...	51
Tabla 10 Diseño de experimentos 3 ² para determinación de las condiciones de concentración de DOQ y luz para el crecimiento de la <i>Chlorella vulgaris</i> con agua residual	54
Tabla 11 Diseño de experimentos 2 ² para determinación de la relación molar lípidos - alcohol metílico a diferentes temperaturas	58
Tabla 12 Diseño de experimentos 2 ² para determinación de la relación de lípidos - alcohol metílico a diferentes porcentajes de enzima	58
Tabla 13 Determinaciones y métodos de prueba para calidad del biodiesel	60
Tabla 14 Caracterización fisicoquímica del agua residual de la industria avícola.....	72
Tabla 15 Parámetros de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para MBB con <i>Chlorella vulgaris</i> en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min	93
Tabla 16 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para MBB con <i>Chlorella vulgaris</i> en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min	94
Tabla 17 Parámetros de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para ARIA con <i>Chlorella vulgaris</i> en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min	104

Tabla 18 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para ARIA con <i>Chlorella vulgaris</i> en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min	105
Tabla 19 Valores de índice de saponificación en Normas Mexicanas	106
Tabla 20 Valores de índice de acidez en Normas Mexicanas	107
Tabla 21 Valores de densidad relativa en Normas Mexicanas	107
Tabla 22 Valores de humedad en Normas Mexicanas	108
Tabla 23 Valores de índice de refracción en Normas Mexicanas	108
Tabla 24 Viscosidad cinemática a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima	111
Tabla 25 Número de ácido a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima	114
Tabla 26 Densidad a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima.....	115
Tabla 27 Punto de nube a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima	117
Tabla 28 Índice de refracción a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima ..	118
Tabla 29 Punto de inflamación a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima	121
Tabla 30 Residuos de carbono a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima.	122
Tabla 31 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Herscher Bulkley y Newton para biodiesel obtenido de transesterificación enzimática con lípidos de <i>Chlorella vulgaris</i> a 35°C y diferentes relaciones molares lípidos:alcohol	124
Tabla 32 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Herscher Bulkley y Newton para biodiesel obtenido de transesterificación enzimática con lípidos de <i>Chlorella vulgaris</i> a 35°C con diferentes % de enzima y relaciones molares lípidos:alcohol.....	126

RESUMEN

Se realizó un estudio de la eliminación de DQO y nitrógeno de las aguas residuales avícolas en fotobiorreactores para establecer las condiciones de operación de se realizó un diseño de experimentos 3^k con dos factores flujo de aire (1.6, 3.2 y 4.8 L m⁻¹) e intensidad de luz (3200, 9800 y 12 000 lux) en Medio Bold Basal una vez establecidas las condiciones de flujo de aire se efectuó un diseño experimental 3^k con agua residual de una industria avícola los factores de estudio fueron DQO (50, 75 y 100%) e intensidad de luz (3200, 9800 y 12000 lux) posteriormente se realizó una extracción de lípidos, con los lípidos obtenidos se realizó obtuvo biodiesel realizando una transesterificación enzimática con lipasa *Acrílica cándida antártica B*. Se realizó un diseño de experimentos 2^k donde los factores estudiados fueron temperatura (35, 45 °C) y relación molar (1:6 y 1:9) y una vez establecidas las mejores condiciones de temperatura se realizó el segundo diseño de experimentos en el cual los factores a estudiar fueron relación molar (1:6 y 1:9) y concentración del biocatalizador (0.5 y 1 % de enzima). Se encontró que la intensidad de luz tiene un efecto significativo sobre la densidad celular y la producción de proteínas, pigmentos y lípidos. Al aumentar la intensidad de luz, la producción de todos los parámetros aumentó ya que las microalgas son microorganismos fotosintéticos. El flujo de aire afectó la producción de pigmentos, y el desarrollo de pigmentos estaba relacionado a la fuente de carbono que los alimentaba. La combinación de bacterias y *Chlorella vulgaris* en aguas residuales favoreció la eliminación de DQO y el proceso de nitrificación. Los lípidos obtenidos cumplieron con la normatividad mexicana en aceites y grasas de origen animal o vegetal, por lo tanto, viables para la producción de biodiesel. Las condiciones a las que se obtuvieron los mejores resultados al realizar la transesterificación enzimática con lipasa B *cándida antártica* fue a una temperatura de reacción de 35°C, empleando 1% en peso de enzima con una relación molar de aceite – metanol de 1:6 en un tiempo de reacción de 8 horas alcanzando un 83.3% de rendimiento.

Palabras Clave: *Agua residual, microalga, Chlorella vulgaris, biodiesel, lipasa Acrílica cándida antártica B*

ABSTRACT

A study of the removal of COD and nitrogen from poultry wastewater in photobioreactors was carried out to establish the operating conditions of a 3^k design of experiments with two airflow factors (1.6, 3.2, and 4.8 L m⁻¹) and light intensity (3200, 9800 and 12000 lux) in Medium Bold Basal once the airflow conditions were established, an experimental design 3^k was carried out with wastewater from a poultry industry the study factors were COD (50, 75 and 100 %) and light intensity (3200, 9800 and 12000 lux). Subsequently, extraction of lipids was carried out, with the lipids obtained, biodiesel was obtained by performing an enzymatic transesterification with *Candida antarctica* lipase B 2^k design of experiments was carried out where the factors studied were temperature (35, 45 °C) and molar ratio (1:6 and 1:9) and once the best temperature conditions were established, the second design of experiments was carried out in which the factors to study were molar ratio (1:6 and 1:9) and concentration of the biocatalyst (0.5 and 1% enzyme). Light intensity was found to have a significant effect on cell density and the production of proteins, pigments, and lipids. By increasing the intensity of light, the production of all parameters increased since microalgae are photosynthetic microorganisms. Airflow affected pigment production, and pigment development was related to the carbon source that fed them. The combination of bacteria and *Chlorella vulgaris* wastewater favored the removal of COD and the nitrification process. The lipids obtained complied with the Mexican regulations in oils and fats of animal or vegetable origin, therefore viable to produce biodiesel. The conditions in which the best results were obtained when carrying out the enzymatic transesterification with *Candida antarctica* lipase B was at a reaction temperature of 35°C, using 1% by weight of enzyme with a molar ratio of oil – methanol of 1:6 in a reaction time of 8 hours reaching 83.3% yield.

Keywords: *Wastewater, microalgae, Chlorella vulgaris, biodiesel, Candida antarctica lipase B*

INTRODUCCIÓN

El consumo total de energía primaria mundial se ha incrementado día a día, debido al crecimiento poblacional y a la modernización. Se prevé que aumente en 57% para el año 2050. Actualmente, más del 80% de la energía total utilizada en el mundo, es proporcionado por combustibles fósiles (Hajjari, et al., 2017), lo cual no es sustentable. Por lo que la crisis energética y el calentamiento global son los dos principales desafíos que enfrenta el desarrollo sostenible del mundo. El desarrollo y el despliegue de fuentes de energía renovables son, por lo tanto, imprescindibles para reducir la carga de combustibles fósiles y mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Mehtani, et al., 2017). Los combustibles líquidos derivados de biomasa orgánica de plantas (biocombustibles), tienen propiedades de combustión similares, con la ventaja de que son derivados de fuentes renovables, y reducen las emisiones netas de carbono (Doshi, et al., 2016).

Los combustibles biológicos se pueden categorizar en biodiesel (derivado de lípidos) y bioetanol (derivado de azúcar) (Mehtani, et al., 2017). La obtención de éste a escala industrial se realiza mediante un proceso químico consistente en una metanólisis de aceites utilizando catalizadores químicos alcalinos (KOH y NaOH). Sin embargo, requiere elevados consumos de energía, la glicerina (subproducto) contamina al catalizador, el uso de álcalis como inductores implica que el alcohol y los glicéridos deben ser anhidros para evitar reacciones de saponificación. Además, es necesario evitar reacciones de neutralización de ácidos grasos libres (Mellado Duran, et al., 2014), por lo que es necesario buscar alternativas para su obtención.

El biodiesel al ser un biocombustible puede ser producido por actividad microbiana, la cual está relacionada con levaduras, hongos, bacterias y microalgas, siendo un método ecológico, económico debido a su bajo costo energético y con rangos de conversión superiores al 90%. Además, el cultivo de microorganismos es de corta duración, requiere poco mantenimiento y cabe destacar que no se ve afectado por el clima (Mellado Duran, et al., 2014). Por lo que la producción de biodiesel utilizando lípidos microbianos es atractiva, ya que los microorganismos oleaginosos pueden acumular cantidades significativas de lípidos y no compiten con la producción de alimentos (Gemma, et al., 2017). La generación de rutas de

producción de energéticos sin intervención de recursos no renovables es vital, para buscar eliminar la dependencia de los energéticos de origen mineral, que existe en la actualidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sobreexplotación de los recursos naturales ha aumentado las preocupaciones mundiales por el cambio climático antropogénicos y la seguridad de la energía, los alimentos y el agua (Rehan, et al., 2018). Esto ha llevado a una crisis energética y la emisión de gases como monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre (SO₂) y óxidos de nitrógeno que producen el efecto invernadero (Hasan & Rahman, 2017) y al cambio climático global (Qunju, et al., 2015) llevan a la búsqueda de combustibles alternativos (Hasan & Rahman, 2017), debido a la predicción del agotamiento de la energía.

La producción comercial de biodiesel a partir de microalgas, a pesar de ser una alternativa ecológica, tiene algunos inconvenientes para su producción comercial dentro del que destacan los requerimientos de agua y de nutrientes. Por otro lado, las aguas residuales de la industria avícola se producen de forma natural y en cantidades considerables, se ha encontrado que el consumo de agua se encuentra entre 8 y 15 L/ave sacrificada (Rojas Morales, et al., 2016), este tipo de agua contiene los nutrientes necesarios y es una fuente económica de agua (Fazal, et al., 2017).

El proceso de transesterificación, tanto ácida como alcalina tiene inconvenientes, por ejemplo, la transesterificación ácida es mucho más lenta que la alcalina. Sin embargo, la alcalina tiene la desventaja de que pueden formarse jabones, el agua empleada interfiere en la reacción lo que no ocurriría con un catalizador enzimático, además, el rendimiento encontrado con estos es más alto que un catalizador alcalino.

La búsqueda de una nueva vía para la producción de biodiesel, a través de una ruta conformada por la integración de un proceso de biorremediación – bioproducción es el fundamento de esta investigación. Cabe destacar que esta ruta romperá con los esquemas tradicionales de producción de energía, al utilizar un proceso microbiológico para la depuración de aguas residuales de una industria avícola a través del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, misma que se usará como fuente de lípidos. Aunado a esto, el uso de la lipasa *Acrílica cándida antártica B*, como biocatalizador para la reacción de transesterificación permitirá realizar una ruta biológica y sustentable, que contribuirá a un mejor y oportuno aprovechamiento de los recursos.

JUSTIFICACIÓN

El consumo mundial de energía total ha aumentado de forma significativa, de acuerdo con la proyección de International Energy Outlook 2016 (IEO2016), el consumo total mundial de energía comercializada se expande en un 48% de 2012 a 2040 (Gebremariam & Marchettie, 2018) y se espera que aumente en un 57% para el año 2050. El 80% de la energía total utilizada es proveniente de los combustibles fósiles (Hajjari, et al., 2017). Debido al agotamiento de las reservas mundiales de petróleo y las crecientes preocupaciones ambientales, existe alta demanda de fuentes alternativas de combustible a base de petróleo, incluidos el diésel y los combustibles de gasolina (Dennis, et al., 2010).

La contaminación del aire está asociada con el uso de combustibles fósiles, se estima que las emisiones promedio mundiales per cápita de CO₂ es de 4.6 t por año. Los países con mayores emisiones son China (28.03 %), Estados Unidos (15.9 %), India (5.81 %), Rusia (4.749 %), Japón (3.84 %), Alemania (2.32 %), Corea (1.78 %), Canadá (1.67 %), Irán (1.63 %) y Brasil (1.41 %) (Hajjari, et al., 2017). Por su parte, México en la conferencia de las Naciones Unidas sobre el cambio climático 2015 (Acuerdo Global COP21) se compromete a disminuir en un 25 % sus emisiones de GEI, para dar cumplimiento a la Ley General de Cambio Climático (2012) (Cámara de diputados del H. Congreso de la Unión, 2018).

El biodiésel ofrece varias ventajas ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (4 veces más rápido que el diésel fósil) y produce menos emisiones indeseables (CO, hidrocarburos aromáticos policíclicos, partículas de hollín, óxidos de azufre y nitrógeno, metales) durante su combustión gracias a su estado oxigenado, siendo menos perjudiciales (Garibay Hernández, et al., 2009). Ha sido considerado como la mejor alternativa para una sustitución de combustible diésel dado que puede emplearse en cualquier motor de encendido por compresión, sin necesidad de modificación (Dennis, et al., 2010).

El biodiésel actualmente derivado de cultivos oleaginosos, aceite de cocina usado o grasa animal, son candidatos para reducir el consumo de combustibles fósiles, pero lamentablemente no pueden satisfacer una pequeña fracción de la demanda existente de combustible para el transporte (Qunju, et al., 2015).

Las microalgas son una fuente rica de aceites de triacilglicerol (TAG) que puede transesterificarse con alcohol para producir biodiesel (Yodsuwan, et al., 2018). Pueden acumular hasta 60 - 70% de lípidos en condiciones adversas, tales como la limitación nutricional, la temperatura, la salinidad, los rayos UV, etc. (Mehtani, et al., 2017). Las microalgas son consideradas como la única materia prima prometedora para la producción de biodiesel, superan en gran medida a las de los cultivos oleaginosos agrícolas, sin competir por tierras de cultivo. Por tal motivo, los biocombustibles a partir de microalgas son considerados como sostenibles, renovables, carbono neutral y de costo efectivo debido a que solo hay un paso o dos de lípidos a biodiesel (Qunju, et al., 2015).

La aplicación de biotecnología enzimática blanca al emplear la lipasa *Acrílica cándida antártica B* como catalizador biológico en el proceso de transesterificación, contribuirá al desarrollo de un proceso sustentable para la producción de biodiesel. Además, se ha encontrado que las técnicas de transesterificación biocatalítica usando lipasas requieren menor gasto energético, con rangos de conversión que exceden el 90% (Mellado Duran, et al., 2014).

La viscosidad del biodiesel es de suma importancia, dado que influye en el comportamiento de atomización y combustión del biodiesel, se puede utilizar para evaluar la eficiencia del biodiesel para sustituir los combustibles de petrodiesel existentes. Altas viscosidades dan como resultado gotas de mayor tamaño afectando la cámara de combustión. Por otro lado, viscosidades bajas pueden no cumplir con los criterios de lubricación, lo que podría conducir a una fuga o desgaste (Aminian & ZareNezhad, 2018). La densidad es otra variable importante dado que afecta el rendimiento del sistema de inyección de combustible y el rendimiento del motor (Kassem & Çamur, 2017). De ahí la importancia de cumplir con la viscosidad cinemática en estándares de biodiesel y de desarrollar perfiles reológicos que permitan definir regiones donde existan ésteres etílicos (biodiesel) a través de la densidad, viscosidad y esfuerzo de corte.

HIPÓTESIS

Es posible la producción de biodiesel a partir de la obtención de parámetros cinéticos y reológicos en una ruta estrictamente biológica; empleando la microalga *Chlorella vulgaris* para la producción de lípidos y la lipasa *Acrílica cándida antártica B* como biocatalizador para el proceso de transesterificación, aplicada a residuos grasos y aguas residuales de la industria avícola.

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO

El biodiesel ha tomado fuerza a nivel mundial como fuente de energía renovable debido a sus ventajas económicas, ambientales y sociales. Sin embargo, su producción ha sido a partir de cultivos alimentarios, oleaginosos no alimentarios y desechos, algas y actualmente se ha trabajado los cultivos oleaginosos genéticamente modificados, dentro del que se incluyen las microalgas. La presente investigación, aportará una evaluación de la cinética de la microalga *Chlorella vulgaris* como fuente de lípidos para la producción de biodiesel.

Por otro lado, para la conversión de lípidos a biodiesel generalmente, se emplea el proceso de transesterificación. Sin embargo, para llevar las reacciones propias del proceso de transesterificación se emplean generalmente catalizadores ácidos o alcalinos y en algunos casos se han empleado enzimas como catalizador biológico. En este proyecto se busca emplear la lipasa *Acrílica cándida antártica B*, permitiendo seguir una ruta estrictamente biológica para la producción de biodiesel.

Es importante destacar la necesidad de realizar una evaluación de la interacción de las dos rutas en un solo proceso aplicable a sustratos con origen en procesos industriales como pueden ser las aguas y grasas residuales. Además, los perfiles reológicos permitirán sustituir a los perfiles lipídicos y definir regiones donde hay ésteres metílicos (biodiesel) y correlacionar el crecimiento de la microalga a través de la densidad, viscosidad y esfuerzo de corte.

OBJETIVOS

Determinación de parámetros cinéticos y reológicos del proceso de producción de biodiesel a partir de la formación de lípidos con *Chlorella vulgaris* y transesterificación con lipasa *Acrílica cándida antártica B*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la cinética del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivadas en aguas residuales de la industria avícola.
- Evaluar las propiedades reológicas del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivadas en aguas residuales de la industria avícola
- Implementar un fotobiorreactor con controles de flujo, temperatura y pH para el cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*
- Evaluar el proceso de transesterificación mediante la lipasa *Acrílica cándida antártica B*.
- Evaluar las propiedades reológicas del biodiesel obtenido del proceso de transesterificación mediante la lipasa *Acrílica cándida antártica B*.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. Biodiesel

El biodiesel es el nombre común que se les da a los ésteres etílicos o metílicos de los ácidos grasos (Saluja, et al., 2016). El biodiesel es un líquido claro de color ámbar, tiene una viscosidad semejante a la del diésel de petróleo. No es inflamable ni explosivo, con un punto de inflamación de 423 K para el biodiesel en comparación con 337 K para el diésel de petróleo. A diferencia del diésel de petróleo, el biodiesel es biodegradable y no tóxico, reduce significativamente las emisiones tóxicas y de otro tipo cuando se quema como combustible, en la Tabla 1 se muestran las características físicas del biodiesel. Tiene la característica de ser completamente miscible en el combustible diésel y tiene propiedades diferentes, por lo que el uso de mezclas de diésel/biodiesel está aumentando (Ventura, et al., 2018).

Tabla 1 Propiedades físicas del biodiesel (Yusuf, et al., 2011)

Nombre común	Biodiesel
Nombre químico común	Ácido graso (m) etil éster o metil éster
Rango de fórmula química	Metil éster C ₁₄ -C ₂₄ ó C ₁₅₋₂₅ H ₂₈₋₄₈ O ₂
Rango de viscosidad cinemática (mm ² /s, a 313 K)	3.3 – 5.2
Rango de densidad (kg/m ³ , a 288 K)	860 – 894
Rango de punto de ebullición (K)	>457
Rango de punto de inflamación (K)	420-450
Rango de destilación (K)	470-600
Presión de vapor (mm Hg, a 295 K)	<5
Solubilidad en agua	Insoluble
Apariencia Física	De color amarillo oscuro, líquido claro
Olor	Olor ligero a moho/jabón
Biodegradabilidad	Más biodegradable que el diésel de petróleo
Reactividad	Estable, evite los agentes oxidantes fuertes.

Los estándares usualmente utilizados como referencia son la norma ASTM D6751 en EUA y las normas europeas EN 14213 (biodiesel para calefacción) y EN 14214 (biodiesel para uso vehicular) (Garibay Hernández, et al., 2009). Las pruebas que demuestran la pureza del biodiesel obtenido son: contenido de agua, glicerina (total y libre), sodio y potasio (Arias Perez, et al., 2011).

Las pruebas que permiten conocer el desempeño como combustible del biodiesel son el número de cetano que indica la calidad de combustión, junto al punto de niebla que se refiere a que temperatura se inicia la formación de cristales (Arias Perez, et al., 2011). En la ASTM se establece el punto de inflamación 130°C mínimo y número de cetano 47 como mínimo (Hasan & Rahman, 2017). Otros aspectos importantes son la determinación de la viscosidad cinemática (Tabla 2) y el índice de acidez dado que incrementan constantemente con el deterioro del combustible (Saluja, et al., 2016). La viscosidad del biodiesel es ligeramente mayor que la del petrodiesel (Knothe & Steidley, 2005).

El poder calorífico también es una característica relevante dado que expresa la energía por unidad de masa que libera la unión química entre un combustible y el comburente. En los biocombustibles el poder calorífico promedio es de 8 % a 15 % menor respecto al diésel producido a partir de petróleo (Arias Perez, et al., 2011).

Tabla 2 Viscosidad cinemática en estándares de combustible diésel (Knothe & Steidley, 2005)

Estándar	Ubicación	Método	Viscosidad cinemática (mm ² /s)
ASTM D6751	Estados Unidos	ASTM D445	1.9 - 6
EN 14214	Europa	ISO 3104	3.5 - 5

El biodiesel ha sido reconocido como una fuente atractiva de combustible diésel (Mehtani, et al., 2017). Las principales ventajas de biodiesel son su renovabilidad, las bajas emisiones, biodegradabilidad y el rendimiento de los motores con biodiesel. Es el único combustible alternativo con la propiedad de que las mezclas de baja concentración de biocombustible y petróleo funcionarán bien en motores convencionales no modificados. Además, se puede almacenar en cualquier lugar donde se almacene combustible diésel de petróleo. Es seguro

de manejar y transportar, se puede usar solo o mezclado; la mezcla más común B20; 20% biodiesel (Yusuf, et al., 2011).

La combustión de biodiesel tiene mayor eficiencia (Dennis, et al., 2010) y reduce más del 90% de hidrocarburos no quemados, también reduce entre el 75 y 90 % de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Otro aspecto relevante es su biodegradabilidad ya que no es tóxico y se degrada aproximadamente cuatro veces más rápido que el diésel de petróleo, su contenido de oxígeno mejora el proceso de biodegradación. Tiene buenas propiedades lubricantes en comparación con el diésel de petróleo; reduciendo el desgaste del motor y de los sistemas de inyección debido a su bajo contenido de azufre. Finalmente, el número de cetano está relacionado con el tiempo de retardo de encendido y la calidad de la combustión; un número de cetano más alto indica mejores condiciones de ignición (Yusuf, et al., 2011) y el biodiesel presenta un mayor número de cetano que el diésel (Dennis, et al., 2010).

1.2 *Chlorella vulgaris*

La microalga *Chlorella vulgaris* es una de las microalgas eucariotas verdes más destacadas, pertenece a la clasificación científica que se muestra en la Tabla 3, en 1890 Martinus Willem Beijerinck, un investigador holandés, la descubrió como la primera microalga con un núcleo bien definido. El nombre *Chlorella* proviene del griego *chloros* que significa verde, y el sufijo latino *ella* se refiere al tamaño microscópico. Morfológicamente es una célula esférica de 2 – 10 µm de diámetro (Safi, et al., 2014).

Tabla 3 Clasificación científica de la microalga *Chlorella vulgaris*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Protista</i>
División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorella</i>
Familia	<i>Chlorella</i>
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>Chlorella vulgaris</i>

1.2.1. Reproducción

La *Chlorella vulgaris* es una célula reproductiva no móvil que se reproduce rápidamente de manera asexual. Cuando se encuentra en condiciones óptimas dentro de las 24 h se multiplica por la autoespulación (este tipo de reproducción es común en las algas). De esta manera se forman 4 células hijas que tienen su propia pared celular dentro de la pared celular de la célula madre y los restos de la célula madre serán consumidos como alimento por las células hijas recién formadas. En Figura 1, se puede observar las diversas fases: (a) la fase temprana de crecimiento celular; (b) fase tardía de crecimiento celular; (c) fase de división del cloroplasto; (d) fase temprana de división de protoplastos; (e) fase divisoria tardía del protoplasto; (f) fase de maduración de las células hijas y (g) fase de eclosión (Safi, et al., 2014).

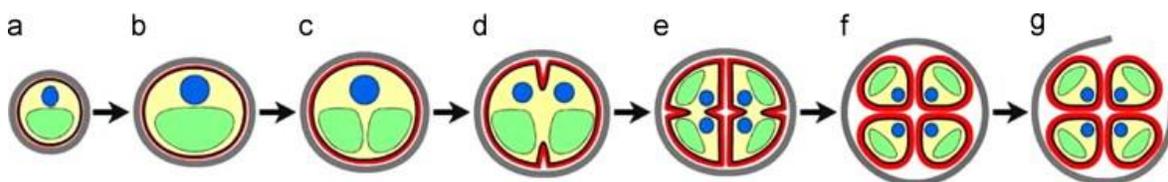


Figura 1 Fases de formación de la pared celular hija en *Chlorella vulgaris* (Safi, et al., 2014)

1.2.2. Composición primaria

La composición primaria de la *Chlorella vulgaris* consiste en: **proteínas**, las cuales están involucradas en el crecimiento, reparación y mantenimiento de la célula, regula las actividades celulares y la defensa contra invasores (42 – 58%); **carbohidratos** los cuales representan un grupo de azúcares reductores y polisacáridos como el almidón (el más abundante en la *C. vulgaris*) y la celulosa; **pigmentos** el más abundante es la clorofila (1 a 2% en peso seco), también contiene carotenoides; **minerales** (micro elementos: K, Mg; macro elementos: Cr, Cu, Zn, Se, Fe), **vitaminas** (solubles en agua: C y B, solubles en grasa: A y E) (Safi, et al., 2014) y **lípidos** compuesto por glicolípidos, ceras, hidrocarburos, fosolípidos y ácidos grasos libres (5 a 40%) (Huang, et al., 2021) (Ramírez-López, et al., 2016). El alto contenido en lípidos hace de esta microalga una especie prometedora para la producción de biodiesel y en consecuencia posee un alto potencial para el reemplazo de combustibles derivados del petróleo. Adicionalmente, se ha encontrado que tienen un alto rendimiento de bioenergía (Fong, et al., 2019).

1.3 Modelo de crecimiento cinético de microalgas

La modelación del crecimiento cinético permite validar la producción de biomasa de microalgas, puede realizarse a partir de modelos no lineales; un modelo logístico y Gompertz (Lam, et al., 2017).

1.3.1 Modelo logístico

El modelo logístico (Domínguez-Viveros, et al., 2013) describe el crecimiento de microbios en función de la densidad de población inicial, el tiempo, la tasa de crecimiento y la densidad de población final. Este modelo fue desarrollado por Pearl y Reed (1977).

$$y = \frac{a}{[1+b*e^{-c*t}]} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde y es $\log \frac{N_t}{N_0}$ tiempo t en horas, T_A es el tiempo en horas, N_t es el recuento microbiano al tiempo T_A en células/mL, N_0 es el recuento inicial en el tiempo inicial también en células/mL, a es la población máxima, b es $[(\mu_{\max}G\lambda/a) + 1]$ y c es $\mu_{\max}G/a$. Donde $\mu_{\max} = a*c$ en h^{-1} y $\lambda = (b - 1)/c$ y $G = \ln(2)/\mu_{\max}$.

1.3.2. Modelo Gompertz

El modelo de Gompertz ha sido ampliamente utilizado y se describe a continuación

$$y_A = a * e^{-b*e^{-c*t}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde y_A es el $\log \frac{N_t}{N_0}$; T_A es el tiempo en horas, N_t es el recuento microbiano al tiempo T_A en células/mL, N_0 es el recuento inicial en el tiempo inicial también en células/mL, a es la población máxima, b es $[(\mu_{\max}G\lambda/a) + 1]$ y c es $\mu_{\max}G/a$. Donde $\mu_{\max} = a*c$ en h^{-1} y $\lambda = (b - 1)/c$ y $G = \ln(2)/\mu_{\max}$.

CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE

2.1 Proceso de producción de biodiésel

El biodiésel al ser un biocombustible generalmente se clasifica de acuerdo con su materia prima y a las tecnologías de producción en cuatro generaciones.

Los biocombustibles a partir de cultivos alimentarios se consideran de primera generación (Azizi, et al., 2018) incluye a los producidos con semillas oleaginosas comestibles. Es decir, los basados en alimentos como por ejemplo la soja (Hajjari, et al., 2017), arroz, trigo, maíz, caña de azúcar, palma de aceite y cebada entre otras materias primas. Aunque estos biocombustibles se han comercializado en todo el mundo, su sostenibilidad ha sido cuestionada debido a sus efectos destructivos sobre el medio ambiente y el ecosistema. Además, no puede satisfacer la demanda mundial energética debido a la competencia con los materiales que se emplean como alimento tanto para animales como para los seres humanos (Azizi, et al., 2018). En conclusión, a pesar de que los cultivos oleaginosos son renovables, la producción de biodiesel en grandes cantidades es insostenible ya que sería necesarias grandes espacios de tierra cultivable, lo que lleva a la controversia existente entre comida versus combustible (Gong & Jiang, 2011).

La segunda generación son los obtenidos a partir de cultivos oleaginosos no alimentarios y desechos (por ejemplo, los jatropha) (Hajjari, et al., 2017). La ventaja de estos es que no compite con los suministros de alimentos, ofrecen mayor rendimiento de producción y requieren tierras más bajas para el cultivo. Tienen el inconveniente de no ser económicamente viables a gran escala (Azizi, et al., 2018).

La tercera generación incluye a todos aquellos producidos con algas (Hajjari, et al., 2017). Estos no tienen las desventajas de los de segunda generación. Se derivan de la biomasa de algas y son el recurso más prometedor. Estas nuevas materias primas alternativas potenciales se pueden utilizar para la generación a gran escala de biocombustibles sin alterar el medio ambiente. Por lo tanto, puede superar los inconvenientes asociados a la primera y segunda generación. Su tasa de producción de biocombustibles es alta comparada con otros debido a su mayor tasa de crecimiento. Sin embargo, los costos de producción son altos y la

rentabilidad es baja por lo que no se han producido a gran escala comercial (Azizi, et al., 2018).

Finalmente, la cuarta generación son los que se producen a partir de cultivos oleaginosos genéticamente modificados (Hajjari, et al., 2017). Los microorganismos modificados genéticamente como las microalgas, las levaduras, los hongos y las cianobacterias son los de cuarta generación. El CO₂ podría convertirse directamente en combustible por estos microorganismos. Las microalgas son células microscópicas o cadenas de células que viven en agua dulce o salina y pueden convertir el dióxido de carbono, el agua y la luz solar en biomasa a través de la fotosíntesis. La tasa de crecimiento y el contenido de aceite de las microalgas son más rápidos y altos que las macroalgas. Es importante destacar que tienen numerosas aplicaciones comerciales. Además, tienen estructuras menos complejas que las macroalgas. Se pueden usar como un valor nutritivo para mejorar los alimentos, como alimento para animales, como materia prima para diferentes industrias (Azizi, et al., 2018).

Los métodos de producción de biodiesel son: mezcla, microemulsificación, craqueo, pirolisis y transesterificación (Shah, et al., 2018) en la Tabla 4 se describen las ventajas, desventajas y los problemas relacionados con cada uno de estos métodos.

Las técnicas para la producción de biodiésel varían dependiendo del tipo de materia prima, nivel de eficiencia, volumen de producción, situación circundante, requisitos de los usuarios finales (Swain, 2014), tipo de catalizador, el alcohol, la temperatura de funcionamiento y el tiempo de reacción química (Shah, et al., 2018). La forma más común de producir biodiesel es a través de la transesterificación (Dennis, et al., 2010). Este proceso es ampliamente utilizado debido a que la viscosidad del aceite vegetal se reduce a través de este proceso (Shah, et al., 2018).

Tabla 4 Métodos para la producción de biodiesel (Dennis, et al., 2010)

Método	Tipo de proceso	Definición	Ventaja	Desventaja	Problemas de uso en motores
Uso directo y mezcla	Físico	Uso directo como combustible diésel o mezcla con combustible diésel	Naturaleza líquida-portabilidad. Contenido de calor (~ 80% de combustible diésel) Fácilmente disponibles; renovabilidad	Mayor viscosidad Menor volatilidad Reactividad de cadenas de hidrocarburos insaturados	Formación de coque y trompeta. Depósitos de carbono Anillo de aceite pegado; espesamiento y gelificación del aceite lubricante
	Físico	Una dispersión de equilibrio coloidal de microestructuras fluidas ópticamente isotrópicas con dimensiones generalmente en el intervalo de 1 – 150 nm formadas espontáneamente a partir de dos líquidos inmiscibles y uno o más anfífilos iónicos o no iónicos.	Mejores patrones de pulverización durante la combustión. Menor viscosidad de combustible.	Menor cantidad de cetano. Menor contenido de energía.	Depósitos pesados de carbono; aumentar la viscosidad del aceite de lubricación.
Craqueo térmico (pirólisis)	Químico	La conversión de una sustancia de cadena larga y saturada (base de biomasa) en biodiesel mediante calor	Químicamente similar a la gasolina y el combustible diésel derivados del petróleo	Energía intensiva y por lo tanto mayor costo	-
	Químico	La reacción de una grasa o aceite con un alcohol en presencia de catalizador para formar ésteres y glicerol	Renovabilidad mayor número de cetano; menores emisiones; mayor eficiencia de combustión	Eliminación de subproductos (glicerol y agua residual)	-
Transesterificación					

2.2 Producción de biodiesel a partir de microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que sólo requieren CO₂, agua y nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio para su crecimiento (Lam, et al., 2017). Las microalgas pueden eliminar grandes cantidades de CO₂ emitidas por las centrales eléctricas y otras fuentes industriales, esto contribuye a la disminución de los gases de efecto invernadero (Gong & Jiang, 2011). Las productividades de biomasa (peso seco por unidad de tiempo por unidad de área) de algunas microalgas son mucho más altas que las de las plantas superiores.

Otras ventajas son su crecimiento rápido (Gong & Jiang, 2011) y que son relativamente fáciles de cultivar y además que se pueden cultivar en tierra no cultivable o en agua, adicional a esto durante el proceso de cultivo requiere un menor consumo de agua en comparación con la biomasa terrestre (de Mendonça, et al., 2018). Por lo que la producción de energía por las algas no compite por la tierra con la producción de alimentos (Swain, 2014) (Gong & Jiang, 2011). El mecanismo fotosintético de las microalgas es rentable en comparación con los microorganismos heterótrofos productores de petróleo que utilizan glucosa y otras fuentes de carbono orgánico (Gong & Jiang, 2011). En la última década se ha encontrado que utilizar aceites de microalgas da mejores rendimientos y precios reducidos (Rehan, et al., 2018).

Las células microalgales tienen un mecanismo fotosintético semejante al de las plantas superiores para fijar el CO₂ y convertir el C en carbohidratos y lípidos, y algunas especies acumulan grandes cantidades de triglicéridos, que son los adecuados para la producción de biodiesel (Gong & Jiang, 2011). Los productos de valor que pueden obtenerse de las microalgas son los pigmentos, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y antioxidantes (López-Pacheco, et al., 2019).

Se considera que las microalgas tienen gran potencial como materia prima para la producción de biodiesel; así mismo para la producción de otros biocombustibles, ya que su producción de aceite es de mayor magnitud que las plantas oleaginosas convencionales (Jämsä, et al., 2017). La alta productividad de lípidos es una característica deseable clave de una especie para la producción de biodiesel, en la Tabla 5 se muestra los valores del contenido de lípidos de diversas microalgas. Otra ventaja de utilizar las microalgas como materia prima es que al ser unicelular garantiza que la biomasa tenga la misma composición bioquímica, lo cual no

ocurre con otras materias primas como las plantas ya que los compuestos de estos varían de acuerdo con las diferentes partes como lo son los frutos, las hojas, las semillas y las raíces (Derner, et al., 2006).

Tabla 5 Promedio de contenido de lípidos (% peso seco) de algunas microalgas (Griffiths & Harrison, 2009)

Especie	Medio	Lípidos (% peso seco) Promedios de la literatura	
		Repleto de nutrientes	Deficiencia de Nitrógeno
<i>Amphora</i>	Marino	51	
<i>Chlorella emersonii</i>	Dulce	29	63
<i>Chlorella minutissima</i>	Marino	31	57
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Dulce	16	64
<i>Chlorella vulgaris</i>	Dulce	25	42
<i>Nannochloris</i>	Marino/Dulce	28	30
<i>Nannochloropsis</i>	Marino	31	41
<i>Nannochloropsis salina</i>	Marino	27	46

Se ha encontrado que la microalga de la especie *Chlorella vulgaris*, en condiciones repletas de nutrientes han alcanzado un contenido promedio de lípidos de hasta el 25% en peso seco, y en condiciones de deficiencia de nitrógeno alcanza hasta un 42 % su peso en seco (Griffiths & Harrison, 2009). Esta microalga ha mostrado altas tasas de eliminación de nitrógeno inorgánico (60 – 86 %) y fósforo inorgánico (78 a 87%) en aguas residuales (Fazal, et al., 2017). Además, las especies de *Chlorella* tienen la ventaja adicional de no ser fácilmente contaminadas por otras cepas de microalgas cuando se cultivan en estanques abiertos (Mehtani, et al., 2017).

El proceso de producción biodiesel a partir de microalgas consta de 5 etapas (Figura 2): la primera es el cultivo de la microalga, la segunda etapa consiste en la cosecha de la biomasa; es decir, la separación de la biomasa del medio de cultivo, en la tercera etapa se realiza la extracción de lípidos (Arias Peñaranda, et al., 2013); los lípidos se pueden convertir en

biodiesel a través de la transesterificación (Fazal, et al., 2017) por lo que es necesaria una cuarta etapa en la que se lleva a cabo el proceso de transesterificación y finalmente la caracterización del biodiesel (Arias Peñaranda, et al., 2013).

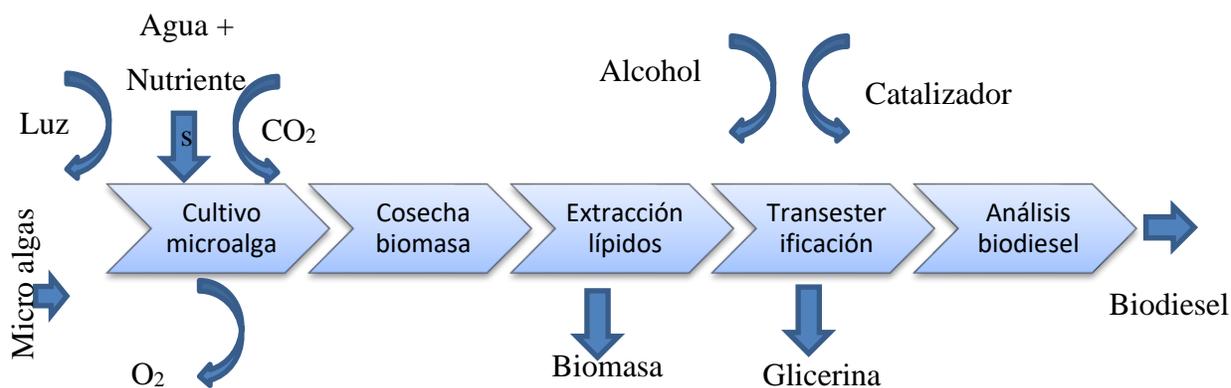


Figura 2 Etapas de producción de biodiesel a partir de microalgas (Arias Peñaranda, et al., 2013)

2.2.1 Cultivo de microalgas

Las microalgas pueden crecer autotróficamente como heterotróficamente, tienen una amplia tolerancia a diferentes temperaturas, salinidad, pH y disponibilidad de nutrientes (Gong & Jiang, 2011).

El cultivo de microalgas puede realizarse en sistemas abiertos naturales (lagos, lagunas o estanques) y artificiales o bien puede realizarse en sistemas cerrados (fotobiorreactores).

Los sistemas abiertos tienen a favor que su infraestructura ya sea de estanques o canales no es costosa y es fácil de operar. Sin embargo, la calidad y cantidad de luz solar natural son afectadas por las variaciones diarias y estacionales (Gong & Jiang, 2011). Tienen desventajas como la pérdida de agua por evaporación, transferencia limitada de CO₂ al cultivo por su baja concentración en el aire y su difusión hacia la atmósfera, control limitado de las condiciones de cultivo, alta susceptibilidad de contaminación, requerimientos de superficies extensas, amplios periodos de producción, producción reducida de biomasa y penetración limitada de

luz (Garibay Hernández, et al., 2009), por lo que, las profundidades que se manejan son de 0.2 a 0.3 m para proporcionar suficiente luz (Gong & Jiang, 2011).

Los sistemas cerrados tienen algunas ventajas con respecto a los abiertos tales como: pérdidas mínimas de CO₂, menor riesgo de contaminación, control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, menores requerimientos de superficie, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción (2 a 4 semanas) y productividades considerablemente superiores (5 a 13 veces) (Garibay Hernández, et al., 2009). Existen diferentes tipos de fotobiorreactores como son los fotobiorreactores tubulares de placa plana, los fotobiorreactores tubulares, los biorreactores de columna. Los biorreactores de columna tienen las ventajas de una mezcla eficiente, una tasa de transferencia de gas volumétrica alta y un alto control flexible de las condiciones de crecimiento. En los fotobiorreactores cerrados interiores, la iluminación puede ser de luz solar natural o lámparas de halogenuros metálicos (Gong & Jiang, 2011).

2.2.2 Cosecha de biomasa

La cosecha de microalgas es un paso crítico y por ende una tarea difícil, dado que generalmente el cultivo es muy diluido, los parámetros que afectan el proceso de recolección son aire (aire disuelto y tamaño de burbuja), mezcla, pH, temperatura, carga superficial, fase de crecimiento, medio de cultivo, tiempo de asentamiento, tamaño celular, floclulantes (dosificación y tipo), pared celular, polisacáridos. Las técnicas de cosecha disponibles incluyen métodos mecánicos, químicos, biológicos, eléctricos o una combinación de dos o más de estos procesos. En la literatura se encuentran reportadas técnicas de cosecha (Figura 3) que incluyen centrifugación, sedimentación por gravedad, filtración, flotación por aire disuelto, floclulación/coagulación, cribado y electroforesis (Fazal, et al., 2017).

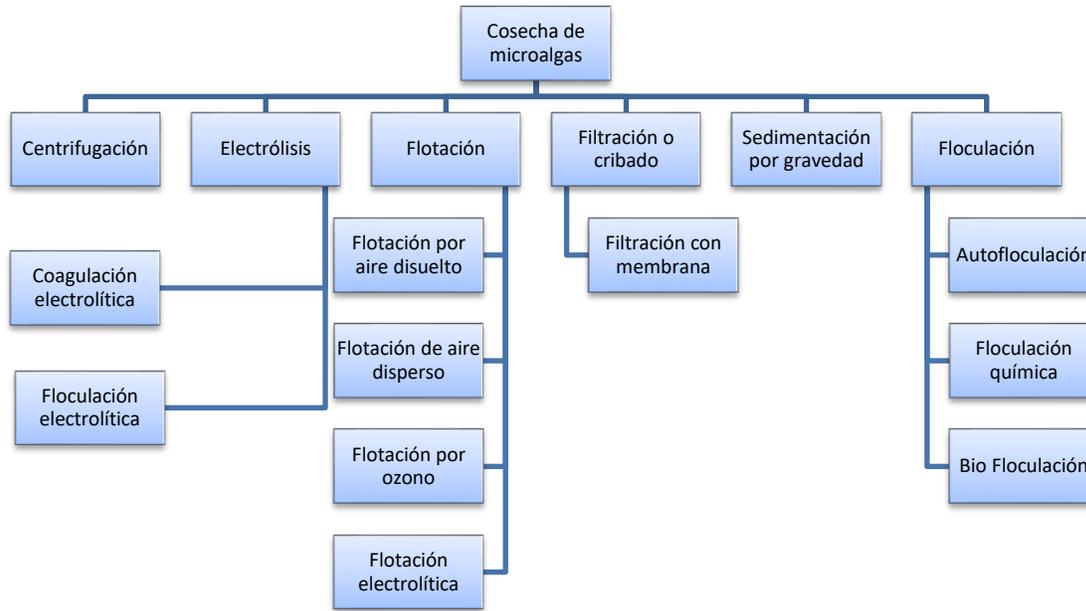


Figura 3 Tipos de métodos de cosecha de microalgas (Fazal, et al., 2017)

La técnica de cosecha más común para la microalga *Chlorella vulgaris* es la centrifugación (5000 rpm, 15 min) con recuperación de hasta el 95%. Es importante mencionar que la morfología de esta microalga permite un alto esfuerzo centrífugo sin dañar su estructura durante el proceso (Safi, et al., 2014).

2.2.3. Extracción de lípidos

La etapa de extracción de lípidos puede realizarse mediante cuatro procesos físico/químicos: extracción mecánica, extracción con solventes, ultrasonicación o mediante fluidos súper críticos (Rehan, et al., 2018).

La extracción con solventes es un método químico, el cual consiste en un lavado repetido de microalgas, que se lleva a cabo a reflujo usando disolventes orgánicos como hexano, benceno, cloroformo, ciclohexano y acetona en un extractor Soxhlet. Este método es rentable y requiere un pequeño volumen de disolventes (Fazal, et al., 2017).

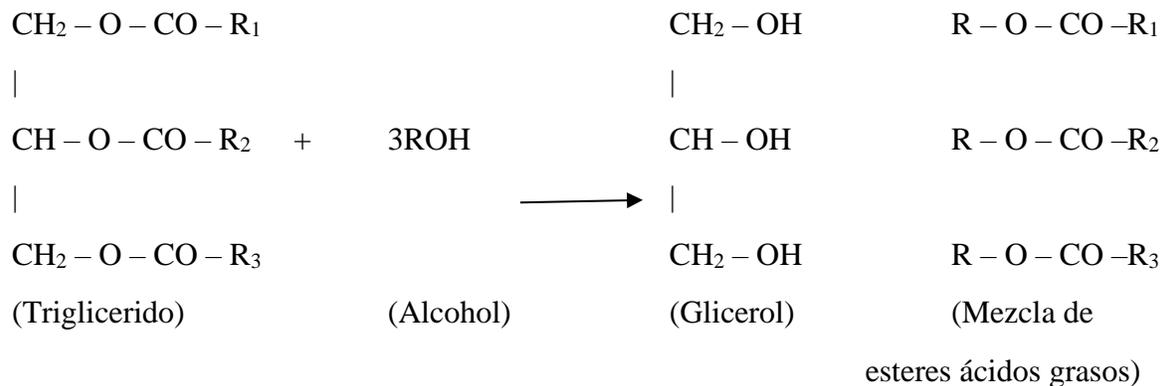
La ultrasonicación es un método físico que utiliza burbujas para romper las paredes celulares y extraer los componentes. Estas microburbujas crean alta temperatura y presión localizadas, y las ondas de choque intensas producidas provocan lisis celular. La extracción ultrasónica

es eficiente, pero depende de la especie, el tamaño de la microburbuja, la densidad celular, la temperatura y la frecuencia (Fazal, et al., 2017). La aplicación de ultrasonido en la producción de biodiesel mejora las características de transferencia de masa que conducen a la velocidad de reacción aumentada con un tiempo corto y además reduce potencialmente el costo de producción (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017).

El secado de la biomasa debe realizarse para la mayoría de los métodos de extracción. El secado al sol es un proceso de deshidratación económico pero lento. El secado en tambor, el secado por pulverización, el secado por lecho fluidizado, el secado por congelación y el secado por deshidratación por ventanas de refractancia son eficientes pero costosos (Gong & Jiang, 2011).

2.2.4. Transesterificación

La transesterificación es un método químico catalítico en el que los triglicéridos se convierten en di-glicéridos que posteriormente se convierten en mono-gliceridos en presencia de alcohol metílico o etílico y de una molécula vinculada a éster llamada biodiesel (Shah, et al., 2018). La forma simplificada de su reacción química se presenta a continuación (Dennis, et al., 2010).



Donde R₁, R₂ y R₃ son hidrocarburos de cadena larga, a veces llamados cadenas de ácidos grasos. Cuando el triglicérido se convierte gradualmente en diglicérido, monoglicérido y finalmente en glicerol, se libera 1 mol de éster graso en cada paso (Dennis, et al., 2010).

Los factores que influyen en la transesterificación son: temperatura de reacción, proporción de alcohol a aceite, cantidad de catalizador, intensidad de mezcla, aceites crudos utilizados y catalizador (Shah, et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente el alcohol y la proporción de este influyen en el proceso de transesterificación. Los materiales de alcohol que se pueden usar en este proceso son metanol, etanol, propanol, butanol y alcohol amílico. El metanol y el etanol se usan con mayor frecuencia. El metanol se utiliza especialmente debido a su menor costo y sus ventajas físicas y químicas. Sin embargo, se ha encontrado que el metanol puede reaccionar rápidamente con los triglicéridos y el catalizador alcalino se disuelve fácilmente en él. Sin embargo, debido a su bajo punto de ebullición, existe un gran riesgo de explosión asociado con los vapores de metanol que son incoloros e inodoros. Tanto el metanol como el metóxido son materiales extremadamente peligrosos que deben manejarse con cuidado. Se debe garantizar que uno no esté expuesto a estos productos químicos durante la producción de biodiesel (Dennis, et al., 2010).

2.3 Comportamiento reológico de la producción de biodiesel con microalgas

Las propiedades reológicas de las suspensiones de microalgas afectan a los fenómenos de transporte en los biorreactores y también en las tecnologías de bioprocesamiento como la cosecha y la deshidratación, y afectan directamente los requisitos de energía y los costos de la producción de biocombustibles. Por ejemplo, la concentración de biomasa de la suspensión de microalgas es sólo 0.5 g/L en estanques abiertos y 5 g/L en fotobiorreactores. Las suspensiones de cultivo de recolección deben deshidratarse tanto como sea posible para simplificar los pasos posteriores para la extracción de lípidos. Generalmente, en la etapa de deshidratación primaria, las suspensiones se concentran entre 100 y 200 veces y se convierten en suspensiones de algas. Y posteriormente, estas suspensiones concentradas de microalgas son bombeadas. En consecuencia, es importante y necesario comprender las propiedades reológicas de las suspensiones de microalgas en un amplio rango de concentración de suspensiones diluidas a lodos concentrados de algas para diseñar fotobiorreactores efectivos y mejorar los procesos posteriores hacia una producción a gran escala de biocombustible (Zhang, et al., 2013)

Las propiedades reológicas de las suspensiones de algas son importantes dado que representan un papel relevante en los requisitos de potencia de agitación y bombeo, por lo que, deben considerarse como uno de los aspectos de diseño para los procesos de producción de algas. (Sirin, et al., 2013). La mayoría de las suspensiones de microalgas muestra un comportamiento newtoniano cuando se encuentran por debajo de las concentraciones críticas y por encima de cierta concentración, algunas suspensiones de microalgas exhibían un comportamiento no newtoniano (Zhang, et al., 2013).

En la Figura 4 se muestran los modelos reológicos independientes al tiempo, donde de acuerdo con la ecuación las variables son: τ = esfuerzo cortante (Pa), τ_0 = límite elástico, γ = gradiente de velocidad (s^{-1}), m = viscosidad dinámica (Pa s), h P = viscosidad plástica (Pa s), K = índice de consistencia (Pa s) y η = es el índice de flujo (adimensional) (Arias Gilart, et al., 2018) (Méndez Contreras, et al., 2016).

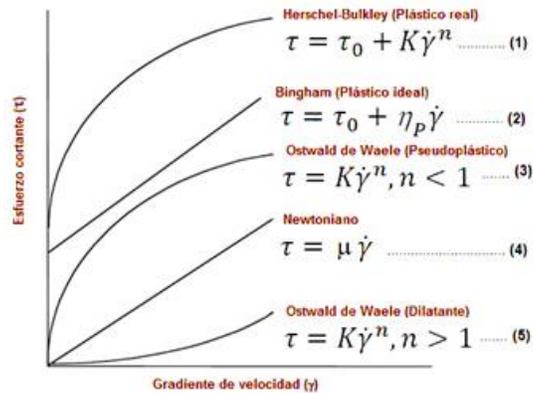


Figura 4 Modelos reológicos independientes del tiempo

2.4 Biocatalizador para la producción de biodiesel

La transesterificación puede realizarse mediante una catálisis ácida, alcalina, enzimática y en condiciones supercríticas (Narváez Rincón, et al., 2004).

El uso de biocatalizadores para producir biodiesel es un método ecológico y con menores costos energéticos que los procesos de transesterificación química (Mellado Duran, et al., 2014). El uso de enzimas soluciona algunos problemas que presentan los catalizadores homogéneos ya que es más fácil realizar la recuperación del glicerol, disminuye la interferencia de los ácidos grasos libres y del agua en la reacción (Narváez Rincón, et al., 2004).

Las lipasas son las enzimas que han demostrado la mayor utilidad a través de reacciones de transesterificación (Gotor, 2002). Es un tipo de biocatalizador que puede catalizar una amplia gama de reacciones, como la transesterificación y la esterificación. Su amplio rango de actividad permite que la lipasa sea potencialmente utilizada como biocatalizador en la producción de biodiesel (Alpha Pollardo, et al., 2018). Específicamente las lipasas, se han utilizado para la producción de ésteres de metanol, etanol y butanol (Narváez Rincón, et al., 2004). Los rangos de conversión con lipasas exceden el 90%. Las lipasas procedentes de bacterias y hongos son las más usadas comúnmente para la transesterificación, y los parámetros óptimos para su uso específico dependen de su origen y formulación (Mellado Duran, et al., 2014).

Cuando se utilizan lipasas se debe considerar temperatura y tiempo de reacción, relación molar alcohol: aceite, tipo de alcohol, el tipo de solvente, pH del medio reactante, microorganismo que genera la enzima y estado libre o inmovilizado de la enzima.

La temperatura de reacción más utilizado es entre 35 – 50 °C, estas temperaturas son menos a las de la catálisis inorgánica debido a que las altas temperaturas desnaturalizan a la enzima, evaporan el solvente cuando éste es utilizado en la reacción y favorece la reacción de hidrólisis.

Por la estequiometria de la reacción se requiere una relación molar 3:1 alcohol: aceite, la cual se debe mantener en la catálisis enzimática, pero como la alcoholisis es reversible, se necesita alimentar un exceso de alcohol para favorecer la reacción directa.

En la catálisis enzimática se presentan dificultades como la baja solubilidad del alcohol con los demás componentes de la reacción y el recubrimiento de la enzima por la glicerina. Para evitar estos inconvenientes se utilizan solventes como hexano, terbutanol, octano, acetona y éter de petróleo (Rojas González, et al., 2010).

2.4.1. La lipasa *B Acrílica cándida antártica* como biocatalizador en la producción de biodiesel.

La lipasa B de la levadura *Cándida antártica* (nombre comercial; Novozyme 435) se basa en la adsorción física de la lipasa en resinas acrílicas macroporosas (Yu, et al., 2021). Es ampliamente utilizada como biocatalizador debido a su alta enantioselectividad, se caracteriza por tener un alto nivel de selectividad de sustrato y su excelente estabilidad térmica (Nielsen†, et al., 2014). La B-lipasa tiene una alta eficiencia como catalizador enzimático en reacciones de transesterificación para la producción de biodiesel (Contesini, et al., 2020). La B-lipasa es considerablemente menos activa cuando interactúa con triglicéridos grandes, pero altamente activa frente a una amplia gama de ésteres. El pH ideal para la catálisis enzimática es de 7, la B-lipasa es estable en un rango de 5.5-8.5 en medio acuoso.

2.5 Comportamiento reológico del biodiésel

Las propiedades reológicas de los biodiesel tanto metílicos como etílicos, son de suma importancia. En el proceso de transesterificación, la viscosidad del material fuente se reduce en aproximadamente un orden de magnitud. La viscosidad es uno de los parámetros críticos en los estándares de biodiesel. Las viscosidades altas pueden generar un arranque y funcionamientos deficientes del motor. Además, la cristalización a bajas temperaturas y la gelificación dan lugar a un aumento de la viscosidad, lo que puede llevar a la obstrucción de filtros y líneas. En la literatura se ha encontrado que el biodiesel y las mezclas tienen adelgazamiento. Es decir, que la viscosidad en estado estacionario disminuye a medida que aumenta la velocidad de cizalladura. Por lo que se espera un comportamiento Newtoniano simple para estos fluidos por encima e incluso para temperatura ambiente, dado que la cristalización, que ocurre a temperaturas mucho más bajas, son el único factor que puede inducir un comportamiento no newtoniano (Alicke, et al., 2015)

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

Para la producción de biodiesel a través de la integración de los procesos de biorremediación – bioproducción (Figura 5), se realizó en 2 etapas principales; la primera consistió en la depuración de aguas residuales de la industria avícola, mediante el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* y en la extracción de lípidos; y la segunda etapa, obtención de biodiesel empleando la lipasa *Acrílica cándida antártica B* como biocatalizador para la reacción de transesterificación.

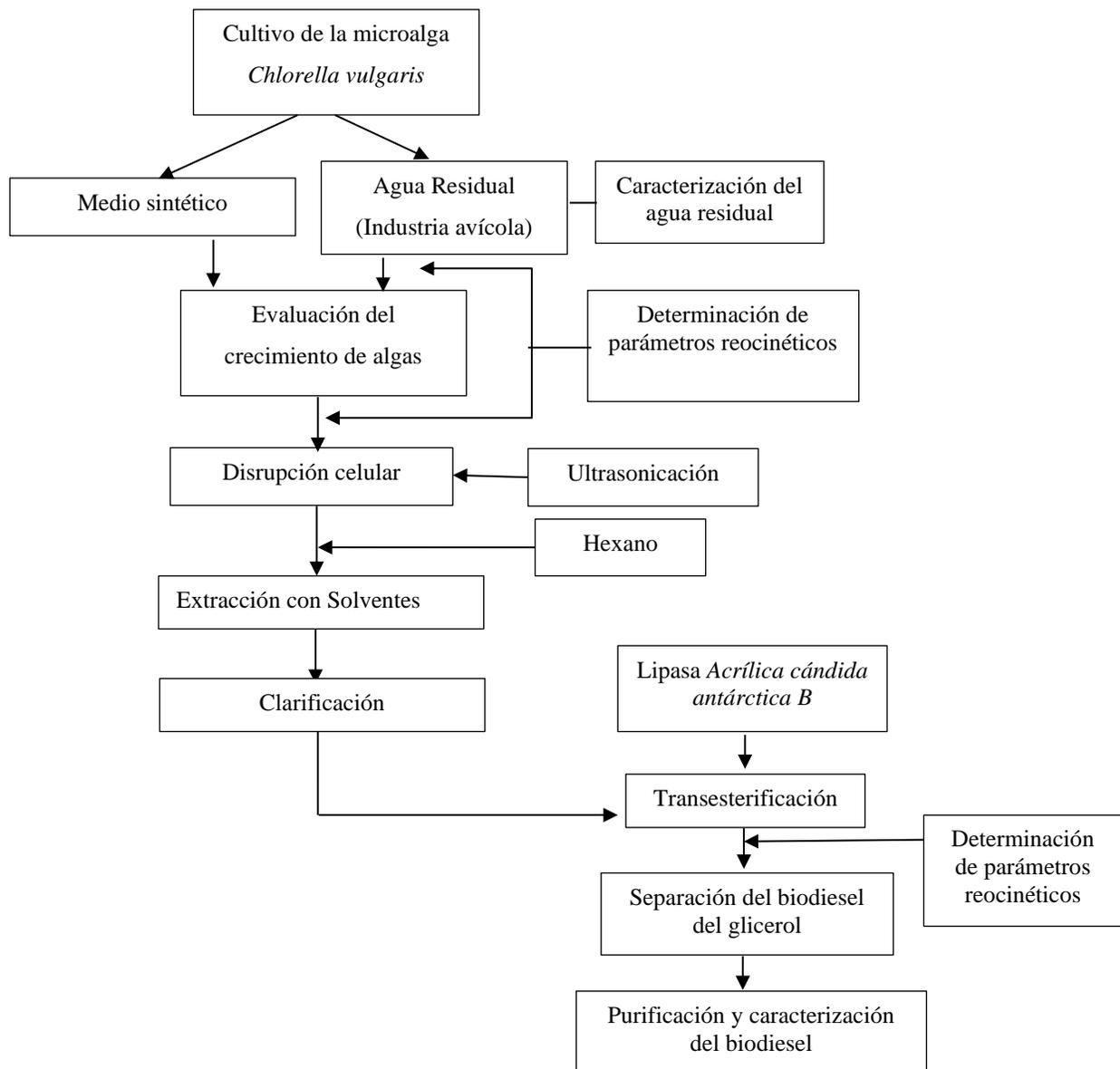


Figura 5 Metodología para la obtención de biodiesel a través de procesos biológicos

3.1 Obtención de microalga *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo *Bold Basal*

Se utilizó una cepa unialgal de *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, con registro GVG001, obtenida de Algas continentales. Ecología y Taxonomía del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

La primera fase consistió en la reproducción de la microalga, la cual se realizó en fotobiorreactores con volumen útil de 250 mL, volumen que se fue duplicando, se utilizó como fuente de luz una lámpara fluorescente color blanco frío en medio de cultivo Bold Basal.

3.1.1 Cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* en medio Bold Basal (MBB)

El medio de cultivo se preparó utilizando las soluciones mostradas en la Tabla 6, para las cuales se utilizaron reactivos de grado analítico, las soluciones tienen una vigencia de 18 meses y se deben conservar en refrigeración. Además, se adicionaron 6 mL de una solución de metales traza (la solución de metales traza se preparó agregando los reactivos en el orden que se muestra en la Tabla 7 y se aforó a 1000 mL). El medio se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15 minutos, se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de vitamina B1 (Tiaminal) se usó una tiamina (HCL) (0.1×10^{-3} g/L) que tuvo un peso de 0.12 g y que se aforó a 100 mL con agua destilada (Daneshvar , et al., 2018). La vitamina puede conservarse congelada durante 2 o 3 años.

Tabla 6 Soluciones para medio Bold Basal (MBB) (Daneshvar , et al., 2018)

Componente/Solución stock	Cantidad por 1 L de solución stock	Cantidad por litro de medio de cultivo	Concentración final en el medio de cultivo
NaNO ₃	25 g	30 mL	8.82 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.5 g	10 mL	0.17 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	7.5 g	10 mL	0.3 mM
K ₂ HPO ₄	7.5 g	10 mL	0.43 mM
KH ₂ PO ₄	17.5 g	10 mL	1.29 mM
NaCl	2.5 g	10 mL	0.43 mM

Tabla 7 Preparación de solución de metales traza

Orden	Reactivo	Cantidad para 1	Concentración final
		L	en el medio
1	Na ₂ EDTA	0.75 g	2 mM
2	FeCl ₃ 6H ₂ O	97.0 mg	0.36 mM
3	MnCl ₂ 4H ₂ O	41.0 mg	0.21 mM
4	ZnCl ₂ 6H ₂ O	5.0 mg	0.037 mM
5	CoCl ₂ 6H ₂ O	2.0 mg	0.0084 mM
6	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	4.0 mg	0.017 mM

El cultivo se realizó a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) utilizando como medio nutritivo el medio Bold Basal, se determinaron las condiciones para el crecimiento de la *Chlorella vulgaris* empleando un diseño de experimentos 3^k con dos factores; aire y luz con tres niveles cuantitativos y tres réplicas cada uno (Tabla 8).

Tabla 8 Diseño de experimentos 3² para determinación de las condiciones de aire y luz para el crecimiento de la *Chlorella vulgaris* en medio sintético

Luz (lux)	Flujo de Aire (L/min)		
	1.6	3.2	4.8
3200	Y6	Y8	Y7
	Y15	Y19	Y10
	Y18	Y23	Y26
9800	Y1	Y5	Y3
	Y13	Y24	Y21
	Y16	Y27	Y25
12000	Y4	Y11	Y2
	Y12	Y17	Y9
	Y22	Y20	Y14

El orden de los experimentos se estableció utilizando Minitab para garantizar la aleatoriedad de los experimentos. Las variables de respuesta fueron tasas de crecimiento, biomasa, tasa de crecimiento específico, productividad de biomasa, densidad relativa. Se realizó un monitoreo del pH y la temperatura cada 24 h y se determinaron proteínas, carbohidratos, pigmentos y lípidos al inicio y al final.

3.1.2 Medición de la tasa de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*

Se determinó la tasa de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante un recuento celular con un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Mujtaba, et al., 2017) marca superior la tiene una superficie conteo de 5 cuadros medianos de 0.2 mm², con una profundidad de la cámara de 0.1 mm, para el conteo se adicionó 0.01 mL de solución algal. Se contabilizaron los 5 cuadros como se muestra en la Figura 6, posteriormente se determinó el número de células mediante la Ecuación 4 el resultado se expresó en millones de células/μL, cuando la densidad celular fue muy elevada se hicieron diluciones para facilitar el proceso.

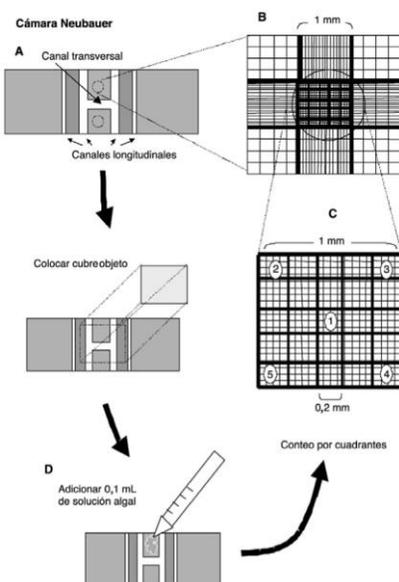


Figura 6 Hemocitómetro o cámara de Neubauer para el conteo de la microalga *Chlorella vulgaris*

$$\frac{\text{millones de células}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{células contadas}}{\text{superficie (profundidad)(dilución)}}$$

Ecuación 3

La densidad óptica se determinó a 688 nm usando un espectrofotómetro (Lam, et al., 2017) de la marca Genesys-10s-UV-Vis, se realizaron diluciones a las cuales se les realizó un recuento mediante la cámara de Neubauer. Finalmente, se realizó una curva de calibración de la absorbancia en nm y de la microalga en millones de células/ μ L.

Para la determinación de las cinéticas de crecimiento para el modelo de Gompertz y el modelo logístico se utilizó una técnica de regresión no lineal empleando el software POLYMATH 6.0 siguiendo la metodología propuesta por Lam, et al., (2017).

3.1.3 Determinación de la biomasa

Se utilizó el peso de las células secas para la determinación de la producción de biomasa. La cual se obtuvo midiendo la concentración total de sólidos suspendidos en el medio de cultivo (Lam, et al., 2017). Se determinó los sólidos suspendidos utilizando un filtro de fibra de vidrio con poro de 1.5 μ m secado y llevado a peso constante a una temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se calculó con Ecuación 5, donde m_2 es la masa del soporte de secado con el filtro; en g, m_1 es la masa del soporte de secado con el filtro antes de la filtración; en g y V es el volumen de la muestra; en mL. Se emplearon 10 mL de muestra.

$$SST = \frac{(m_2 - m_1)}{V} 1 \times 10^6 \quad \text{Ecuación 4}$$

3.1.4 Evaluación de densidad relativa

La densidad relativa se determinó con base a la NMX-F-075-1987, el método consistió en determinar la masa a volúmenes iguales de agua y de solución algal para calcular la relación entre ambos valores, bajo condiciones específicas de temperatura, 25°C . Se empleó un picnómetro limpio con mezcla sulfocrómica y enjuagado con agua, posteriormente se bañó con etanol y éter etílico y se dejó secar. La densidad relativa (ρ_R) a la temperatura de 25°C con respecto al agua a la misma temperatura se calculó con la Ecuación 5 en donde M_1 es la masa del picnómetro con muestra, M es la masa del picnómetro vacío, M_2 es la masa del picnómetro con agua.

$$\rho_R = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} \quad \text{Ecuación 5}$$

3.1.5 Evaluación de pigmentos

La evaluación de los pigmentos se hizo mediante una extracción con acetona al 90% para la microalga *Chlorella vulgaris*, se realizó una medición espectrofotométrica. Se utilizó una muestra de biomasa fresca, la cual fue recolectada por centrifugación de 2 mL de cultivo de microalgas a 8 000 rpm durante 10 min, se utilizó una centrifuga marca Chamipon S-50D, después se agregaron 3 mL de acetona al 90%. Posteriormente, se realizó la extracción de pigmentos en completa oscuridad tapados herméticamente y refrigerados a 4 °C por 20 h, una vez transcurrido el tiempo se realizó una agitación durante 30 s con un mezclador vortex y posteriormente se utilizó un proceso de ultrasonicación para lo que se empleó una sonda ultrasónica SONICS durante 1 min, con pulsos de 50 y 10 s, con una amplitud del 100%. Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 min y posterior a esto se realizó el análisis espectrofotométrico para lo cual; se utilizó un espectrofotómetro marca Genesys-10s-UV-Vis (Silveira-Font, et al., 2018).

Las mediciones espectrofotométricas de clorofilas a, b y carotenos, a una longitud de onda de 480, 630, 647 y 664 nm, se utilizó un blanco de acetona al 90%. Las concentraciones de pigmentos ($\mu\text{g/mL}$) se determinaron mediante las siguientes ecuaciones y por sumatoria la concentración de clorofilas totales:

$$\text{Clorofila a} = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{Clorofila b} = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\text{Clorofilas totales} = \text{Clorofila a} + \text{Clorofila b} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\text{Carotenos} = 4.0 * A_{480} \quad \text{Ecuación 9}$$

3.1.6 Evaluación de proteínas

La evaluación de las proteínas se realizó por el método de Lowry utilizando albúmina como estándar de acuerdo con la técnica descrita por (Alvarado, et al., 2008) y por (Aguilar-May & Sánchez-Saavedra, 2009), se adicionó a la muestra un reactivo para la formación de un complejo coloreado con las proteínas, en donde la intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas. Se utilizó una muestra de 5 mL de suspensión celular a la cual se le realizó un pretratamiento que consistió en añadir 5 mL de NaOH 1 N, se agitó y se llevó a

baño María a una temperatura de 100 °C por 5 min. Posteriormente, se tomó 1 mL de muestra y se añadió 5 mL de reactivo de Lowry, se agitó vigorosamente durante 30 s y se dejó reposar por 10 min, se agregó 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se protegió la muestra de la luz durante 30 min para favorecer la formación del color. Finalmente, se realizó la medición con un espectrofotómetro marca Genesys-10s-UV-Vis a una longitud de onda de 740 nm. Las concentraciones se calcularon mediante una curva de calibración utilizando una solución patrón de albúmina de suero bovino.

3.1.7 Evaluación de contenido lipídico

Se realizó la extracción y cuantificación de lípidos totales (González Delgado, et al., 2012), la técnica consistió en pesar de 50 a 100 mg de biomasa seca en tubos de ensayo, se adicionó 3.8 mL de la solución A (12 mL de metanol, 6 mL de cloroformo y 4 mL de agua destilada), el tubo de ensayo se dejó en reposo por 24 horas en completa oscuridad a temperatura ambiente, con la finalidad de favorecer la extracción de lípidos. Posteriormente, se centrifugó a 3600 rpm por 5 min el tubo de ensayo que contiene las soluciones y el sobrenadante se transfirió con una pipeta Pasteur, a un tubo de ensayo previamente pesado. A la biomasa que quedó en el primer tubo se le adicionó 1.9 mL de la solución A y se agitó en el vórtex durante 1 min, la mezcla se volvió a centrifugar a 3600 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió al tubo que contenía la fracción lipídica de la primera extracción, a los solventes contenidos en el tubo pesado se le adicionaron 1.5 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada esto permitió la separación de la fracción lipídica (inferior) e hidro-alcohólica (superior). El extracto lipídico se centrifugó a 3500 rpm por 5 min, por último, se retiró la fracción hidro-alcohólica y se llevó a sequedad en el horno a 60 °C por 24 horas hasta peso constante. El contenido de lípidos se calculó con la siguiente ecuación y el resultado se expresó en g lípidos/100 g biomasa:

$$\text{Contenido Específico} = \frac{(\text{Peso tubo con lípidos}) - (\text{Peso tubo sin lípidos})}{\text{Biomasa pesada}} * 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

3.1.8 Evaluación de contenido de carbohidratos

Se realizó la cuantificación de carbohidratos por el método de DuBois también conocido como el método fenol-sulfúrico, esta es una técnica espectrofotométrica. Se tomaron 2 mL muestra, posteriormente se adicionó 1 mL de una solución de fenol al 5 %; después se adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, el procedimiento se realizó rápidamente entre cada una de las adiciones de los reactivos y directamente sobre el líquido y no sobre las paredes del tubo. Los tubos se dejaron reposar por 10 min, posteriormente se realizó una agitación vórtex durante 30 s, al finalizar se dejó 20 min en reposo en un baño de agua a temperatura ambiente para el desarrollo del color. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro marca Genesys-10s-UV-Vis a una longitud de onda de 490 nm (López-Legarda, et al., 2017). Las concentraciones se calcularon mediante una curva de calibración previamente realizada con glucosa.

3.2 Obtención de microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola (ARIA)

Una vez determinadas las condiciones de flujo de aire y luz para obtener las mejores condiciones de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en BBM, se empleó agua residual de una industria avícola como medio de cultivo.

Se realizaron muestreos simples con un muestreador; E/S Composite sampler, el cual fue previamente enjuagado en repetidas ocasiones con agua residual. Las muestras se preservaron durante el transporte por medio de un baño de hielo y posteriormente se refrigeraron a 5 °C (NMX-AA-003-1980). Es importante mencionar que el agua muestreada (Figura 7) fue previamente tratada (tratamiento aerobio, filtración y separación de grasa de pollo).



Figura 7. Punto de muestreo en industria avícola

3.2.1. Caracterización del agua residual avícola

Se determinó el nivel de contaminación del agua residual avícola con una caracterización del agua residual de acuerdo con las Normas Mexicanas tal como se muestra en la Tabla 9. Los parámetros analizados fueron pH, oxígeno disuelto, temperatura, turbidez, DQO, fósforo, nitritos y sólidos suspendidos, así como sólidos totales.

Tabla 9 Normas Mexicanas empleadas para la caracterización del agua residual avícola

Parámetro	Norma Mexicana	Parámetro	Norma Mexicana
pH	NMX-AA-008-SCFI-2016	DQO	NMX-AA-030/1-SCFI-2012
Temperatura	NMX-AA-007-SCFI-2013	Fósforo total	NMX-AA-029-SCFI-2001
Oxígeno disuelto	NMX-AA-012-SCFI-2001	Nitritos	NMX-AA-099-SCFI-2006
Turbidez	NMX-AA-038-SCFI-2001	Sólidos suspendidos (SS), sólidos totales (ST) y sólidos totales volátiles (STV)	NMX-AA-034-SCFI-2015

3.2.1.1. Determinación de pH, temperatura, oxígeno disuelto y turbidez

Para la determinación de pH (NMX-AA-008-SFCI-2016) se utilizaron 50 mL de muestra utilizando un potenciómetro de la marca Conductronic PC45, mismo que se empleó para la medición de temperatura siguiendo la metodología descrita en la NMX-AA-007-SCFI-2013.

La medición del oxígeno disuelto se realizó con el procedimiento descrito en la norma NMX-AA-012-SCFI-2001, la muestra fue previamente centrifugada a 4000 rpm por 25 min y la medición se realizó con un LTLutron YK-22DO en mg/L.

La metodología descrita en la norma NMX-AA-038-SCFI-2001 se siguió para la determinación de turbidez, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 25 min, se empleó un turbidímetro marca OAKTON T-100.

3.2.1.2. Determinación de DQO

La determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se realizó de acuerdo con la norma NMX-AA-030/1-SCGI-2012, se utilizaron 2 mL de muestra previamente centrifugada a 4000 rpm por 25 min, se adicionó 1 mL de solución digestora y 2mL de solución sulfato de plata más ácido sulfúrico, se realizó una agitación con vortex por 30 segundos, posteriormente se llevó a digestión por 2 horas a 150°C, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se realizó una lectura en un espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis a 620 nm. La concentración se determinó utilizando una curva estándar.

3.2.1.3. Determinación de nitritos

Para la determinación de nitritos se utilizó el procedimiento descrito en la norma NMX-AA-099-SCFI-2006; se utilizaron 50 mL de muestra previamente centrifugada a 4000 rpm durante 25 min, se filtró por membrana 0.45 µm, se adicionaron 2 mL de reactivo de Zambelli, se agitó levemente y se dejó reposar por 2 min, posteriormente se adicionaron 2 mL de amoníaco, se agitó levemente y se dejó reposar 5 min, se realizó una lectura en espectrofotómetro de la marca Genesys 10s UV-Vis a una longitud de onda de 425 nm, la concentración se determinó utilizando una curva estándar.

3.2.1.4. Determinación de fósforo total

Se utilizó la técnica descrita en la norma NMX-AA-029-SCFI-2001, se empleó una alícuota de 50 mL previamente centrifugada a 4000 rpm por 25 min, se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL donde previamente se pesaron 2 g de carbón activado, se agitó durante 5 min y se filtró a través de papel filtro por membrana de 0.45 μm , posteriormente se tomaron 10 mL de muestra y se pusieron en un matraz aforado de 25 mL donde se adicionaron 5 mL del reactivo vanadato-molibdato, se aforó con agua destilada a 25 mL. Se dejó reposar por 10 min para desarrollar el color y midió en un espectrofotómetro Genesys-10s-UV-Vis a una longitud de onda de 420 nm, la concentración se determinó utilizando una curva estándar.

3.2.2. Cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual avícola

Se utilizó un flujo de aire de 3.2 L/min para promover el crecimiento de la microalga en agua residual avícola, y se determinaron las mejores condiciones de luz y de DQO para el crecimiento de la microalga en agua residual de la industria avícola, para lo cual se utilizó un diseño de experimentos 3^k con los factores luz y concentración de DQO con tres niveles cuantitativos con tres réplicas cada uno (Tabla 10), el orden de los experimentos se estableció utilizando Minitab para garantizar la aleatoriedad de los experimentos. Se emplearon reactores con un volumen útil de 4 L y se inoculó con microalga previamente adaptada. La adaptación se realizó en condiciones de 9800 lux y 3.2 L/min y una concentración de agua residual avícola del 75% equivalente a 1250 mg/L, inoculada con microalga *Chlorella vulgaris* previamente cultivada en BBM utilizando 3.41×10^5 de células por μL de agua residual.

Las variables de respuesta fueron tasa de crecimiento, biomasa, tasa de crecimiento específico, productividad de biomasa, densidad relativa, DQO, nitritos, fósforo disuelto, turbidez, sólidos totales, sólidos suspendidos, sólidos volátiles. Se realizó un monitoreo del pH y la temperatura cada 24 h y se determinaron proteínas, carbohidratos, pigmentos, color y lípidos al inicio y al final.

Tabla 10 Diseño de experimentos 3² para determinación de las condiciones de concentración de DOQ y luz para el crecimiento de la *Chlorella vulgaris* con agua residual

Luz	Agua Residual		
	DQO (50 %)	DQO 2 (75 %)	DQO 3 (100 %)
3200	Y4	Y1	Y2
	Y16	Y9	Y21
	Y17	Y18	Y24
9800	Y5	Y3	Y11
	Y15	Y8	Y12
	Y23	Y25	Y13
12000	Y10	Y7	Y6
	Y14	Y19	Y20
	Y22	Y27	Y26

3.3. Medición de las propiedades reológicas en la suspensión de microalgas

La viscosidad efectiva se realizó a 20°C y se utilizó un viscosímetro digital Brookfield DV2T con la aguja ULA, para ello se determinó a diferentes velocidades (0-200 rpm), se procedió a tomar de 16 a 20 mL de muestra, la cual se colocó en el adaptador UL de acero inoxidable y se realizaron las mediciones de viscosidad (cP), torque (%), fuerza de cizalla (Pa), rango de corte (s⁻¹), temperatura (°C) y precisión del equipo, donde se utilizó la relación existente entre velocidad y esfuerzo de cizalla para la curva que expresa la viscosidad de las muestras.

3.3.1. Fotobiorreactor para la producción de biomasa

Para la producción de biomasa se realizó en un fotobiorreactor de la marca Applikon sin tubo concéntrico, en la parte inferior cuenta con un difusor de aire con un diámetro de 0.045 m,

además de una chaqueta de enfriamiento. La Figura 8 muestra la geometría del fotobiorreactor. La altura total es de 0.6 m y la altura operativa es de 0.52 m. El fotobiorreactor se divide en 3 secciones: la sección superior tiene una forma cilíndrica con un diámetro de 0.14 m y una altura de 0.165 m, la sección central tiene forma de cono truncado con un diámetro superior de 0.14 m y un diámetro inferior de 0.065 m y una altura de 0.075 m, y la parte inferior tiene una forma cilíndrica con un diámetro de 0.065 m y una altura de 0.28 m. Las paredes tienen un espesor de 0.0035 m. El volumen utilizado fue de 4 L. La parte superior estaba equipada con temperatura, pH y agua disuelta, sensores de oxígeno, así como el sistema de alimentación del reactor. El cultivo fue con MBB con una intensidad lumínica de 12000 lux y un caudal de aire de 4.8 L/min. Para el cultivo con ARIA, las condiciones de luz y aire utilizadas fueron las mismas

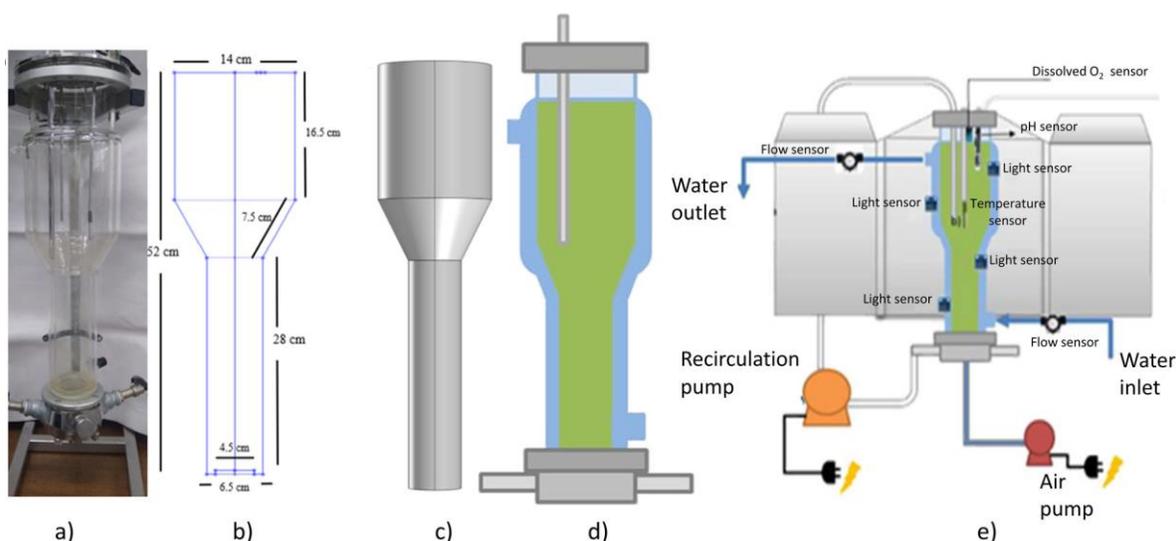


Figura 8. (a) Fotobiorreactor, (b) Dimensiones y geometría del interior, (c) geometría del interior, (d) fotobiorreactor con chaqueta de enfriamiento, y (e) fotobiorreactor con sensores.

3.3.2. Determinación de número de Reynolds y tamaño de burbuja

Se utilizaron fotografías digitales para determinar la velocidad y diámetro de burbuja. El diámetro de la burbuja se determinó en áreas donde no había coalescencia cerca del difusor. Este análisis estadístico se realizó con los diferentes flujos de alimentación de aire (L/min). El diámetro estadístico o la media de Sauter se determinó usando la Ecuación 11; este diámetro da una buena representación de una burbuja típica. (Gordiychuk, et al., 2016).

$$D_B = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} d_i^3}{\sum_{i=1}^{\infty} d_i^2} \quad \text{Ecuación 11}$$

Se utilizó el número de Reynolds para determinar el comportamiento del fluido dentro del reactor usando el modelo clásico del número de Reynolds mostrado en la Ecuación 12 y una ecuación modificada (Ecuación 13) basada en lo publicado por (Madlener, et al., 2009), que incluye la viscosidad aparente e índice de consistencia en el cálculo del Reynolds número, donde ρ es la densidad del fluido en kg/m^3 , D_B es el diámetro de la burbuja, U_B es la velocidad de la burbuja m/s, y K es la viscosidad aparente en $\text{Pa}\cdot\text{s}$.

$$Re = \frac{\rho D_B U_B}{\mu} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$Re = \frac{\rho D_B^n U_B^{2-n}}{K \left(\frac{3n+1}{4n}\right)^n 8^{n-1}} \quad \text{Ecuación 13}$$

3.3.3 Recolección de biomasa de microalgas

La recolección de biomasa de microalgas se realizó mediante decantación. Primero se dejó sedimentar hasta que se separó en dos fases, posteriormente, se realizó la decantación. La capa superior contuvo algunas microalgas suspendidas y la capa inferior contuvo la biomasa concentrada, ésta capa se sometió a un proceso de secado a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h (Lam, et al., 2017).

3.3.4. Disrupción celular por ultrasonido

Inicialmente se realizó un macerado, para el cual se pesaron 10 g de microalga y se agregó 30 mL de etanol, se dejó reposar 5 días en refrigeración a $4\text{ }^\circ\text{C}$ para degradar la pared celular, posterior a esto, se realizó una disrupción celular por ultrasonido para lo cual se utilizó un baño ultrasónico marca BRASON modelo 8892, se configuró a una frecuencia de 40 kHz, 200 W por periodos de 5 min, por 1 min de descanso hasta alcanzar los 30 min. Posteriormente, se utilizó un ultrasonido de sonda marca SONICS operado a 85 A (30 s encendido – 5 s apagado).

3.3.5. Extracción de lípidos de microalgas con solventes

Se utilizaron solventes orgánicos, hexano y la extracción se realizó con Soxhlet, la microalga macerada se colocó en un cartucho de papel filtro, dentro del sifón del equipo Soxhlet, se adicionaron 150 mL de hexano. Se calentó hasta 100 – 130 °C durante 8 horas, realizándose 8 reflujos. Se dejó enfriar y se conservó en oscuridad.

El hexano se recuperó en un rotavapor a 50°C a 4 rpm por 10 min, posteriormente el matraz se lavó con 5 mL de hexano, los lípidos restantes se purificaron. La purificación se realizó agregando 5 g de carbón activado a la muestra que contiene aceite, pigmentos y clorofila, una vez adicionado el carbón se tapó y se selló con papel aluminio y se dejó en reposo durante 4 días, se filtró con papel filtro de membrana a 0.45 µm y un embudo de filtración rápida, finalmente se añadieron 5 mL de cloroformo al carbón residual, con la finalidad de arrastrar el lípido que se haya quedado en el vaso y en el papel.

3.3.6. Extracción de lípidos de microalgas con solventes

Se determinó el contenido lípido, para lo cual se pesó un tubo y se llevó a peso constante, se añadió una muestra previamente filtrada y se dejó secar en un horno de la marca Ecoshel modelo 9023A a 60 °C durante 24 horas, lo que permitió eliminar los restos de hexano, hasta obtener un peso constante, finalmente se dejó enfriar y se pesó calculando el porcentaje de lípidos con la Ecuación 14.

$$\% \text{Lípidos} = \frac{\text{Peso tubo con muestra} - \text{peso tubo vacío}}{\text{peso de biomasa seca}} 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

3.3.7. Caracterización de lípidos

La caracterización de los lípidos se realizó utilizando las normas mexicanas, se determinó el índice de saponificación (NMX-F-174-SCFI-2014), índice de acidez (NMX-F-101-SCFI-2012), densidad (NMX –F-075-SCFI-20112), humedad y material volátil (NMX-F-074-S-1987), índice de refracción (NMX-F-074-S-1981).

3.4 Producción de biodiesel mediante transesterificación enzimática

Para la producción de biodiesel mediante la transesterificación con la enzima lipasa *Acrílica cándida antártica* B, como biocatalizador, se empleó un diseño de experimentos 2^2 Tabla 11, con 2 niveles cuantitativos para cada factor y 3 réplicas, se estudiaron diversas relaciones molares de alcohol etílico a diferentes temperaturas.

Tabla 11 Diseño de experimentos 2^2 para determinación de la relación molar lípidos - alcohol metílico a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Relación molar	
	1:6	1:9
35	Y5	Y2
	Y11	Y4
	Y12	Y8
45	Y1	Y3
	Y7	Y6
	Y9	Y10

También se realizó una evaluación para determinar la concentración de enzima y la relación molar con un diseño de experimentos 2^2 (Tabla 12), con 2 niveles cuantitativos para cada factor y 3 réplicas, los factores evaluados fueron porcentaje de enzima (0.5 y 1) y relación molar lípido:alcohol (1:6 y 1:9).

Tabla 12 Diseño de experimentos 2^2 para determinación de la relación de lípidos - alcohol metílico a diferentes porcentajes de enzima

% de enzima	Relación molar	
	1:6	1:9
0.5	Y1	Y11
	Y5	Y3
	Y9	Y7
1	Y2	Y4
	Y10	Y12
	Y6	Y8

3.4.1 Obtención de ésteres metílicos por transesterificación enzimática

La transesterificación enzimática se realizó con la lipasa Novozym 435, se llevó a cabo en un matraz de 3 bocas de 100 mL, se utilizó un medidor de temperatura de la marca conductronic modelo PC45, se conectó un condensador y este mismo se conectó a un baño de circulación refrigerado marca BROOKFIELD modelo TC-500.

En el matraz de 3 bocas se añadieron 20 g de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* previamente tratados, se realizó una agitación magnética a 300 rpm después se agregó metanol de acuerdo con los diferentes diseños de experimentos por lo que fue variando la relación molar lípido:metanol, se esperó que la temperatura de la reacción alcanzara 30°C, una vez alcanzada la temperatura se añadió 13 g de alcohol ter-butílico.

Para el diseño experimental 1 (Tabla 11) se adicionó 0.015 g de la enzima lipasa *Candida antarctica*, cuando se alcanzó la temperatura deseada en ese instante se consideró el tiempo inicial ($t=0$), la reacción duró 8 horas con agitación magnética constante a 500 rpm. Para el diseño experimental 2 (Tabla 12) se siguió el mismo procedimiento variando ahora el porcentaje de enzima, sin embargo, en este diseño experimental la temperatura de reacción fue de 45°C. Cuando finalizó la reacción se efectuó una filtración en un embudo de filtración rápida y posterior a esto se utilizó un embudo de separación, esta serie de filtraciones se realizaron para retener la enzima utilizada en la reacción, la mezcla recolectada en el embudo de separación se dejó reposar durante 12 horas para alcanzar una buena separación de fases

3.4.2 Recuperación de la enzima

El procedimiento utilizado para la recuperación de la enzima fue el siguiente, inicialmente se realizó la filtración de la mezcla producida por la reacción de transesterificación empleando un embudo de filtración con papel filtro, la enzima retenida se colocó en un nuevo embudo de filtración rápida limpio y seco. Se lavó directamente sobre el interior del papel filtro con 3 series de 5 mL de hexano para arrastrar los residuos adheridos a la enzima, para evitar que la enzima quedara contaminada. La enzima se dejó escurrir por completo para filtrar todo el solvente del lavado durante 12 horas, se llevó a refrigeración.

3.4.3 Lavado del biodiesel

Se realizó el lavado del biodiesel por lo que el producto de la reacción de transesterificación filtrado se dejó reposar en el embudo de separación durante 12 horas. Se retiró la fase inferior la cual no corresponde al biodiesel y posteriormente se lavó el biodiesel con agua destilada eliminando los residuos de la reacción, se dejó en reposo durante 8 horas permitiendo la separación entre biodiesel y la fase residual y así retirar la fase, el lavado se realizó 3 veces. Finalmente, la fase contenida en el embudo de separación se traspasó a un vaso de precipitado y posteriormente se introdujo en el horno de secado (Ecoshel Modelo 9023A) a 60 °C para eliminar los residuos de alcohol.

3.4.4 Determinación de la calidad del biodiesel

Para la caracterización del biodiesel se emplearon las normas ASTM (Sociedad Americana de Pruebas y Materiales) y EN (Normas Europeas), las mediciones realizadas fueron densidad, índice de refracción, corrosividad al cobre, punto de inflamación, residuos de carbono, punto de nube, número ácido y viscosidad cinemática, las técnicas utilizadas para cada una de ellas se encuentran en las normas mostradas en la Tabla 13.

Tabla 13 Determinaciones y métodos de prueba para calidad del biodiesel

Determinación	Método de prueba (Norma)
Densidad	ASTM D1298
Índice de refracción	ASTM D1218 - 12
Corrosividad al cobre	ASTM D-130 EN 2160
Punto de inflamación	ASTM D92
Residuos de carbono	ASTM D4530-15
Punto de nube	ASTM D2500-17
Número de ácido	ASTM D664 EN 14104
Viscosidad	ASTM D445

3.4.5 Medición de las propiedades reológicas

Se efectuó la determinación de viscosidad de acuerdo con la norma internacional ASTM D445 “Viscosidad de líquidos transparentes y opacos”. El rango de viscosidad cubierta por este método de prueba es de 0.2 a 300,000 cp a todas las temperaturas. Se usó un viscosímetro, marca BROOKFIELD modelo DV2T, el cual se conectó a un baño de circulación refrigerado marca BROOKFIELD modelo TC-500, se vertió aproximadamente 16 mL de biodiesel al recipiente cilíndrico exterior, posteriormente se introdujo un cilindro interno y se elevó la temperatura hasta que alcanzó los 60°C y se conectó cuidadosamente al viscosímetro. Se determinó el torque, esfuerzo cortante en Pa, velocidad de corte en 1/s. En intervalos de velocidad de 10 rpm, desde 0 rpm hasta 200 rpm.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Evaluación de la densidad celular de *Chlorella vulgaris* en MBB

El medio Bold Basal (MBB) usado ampliamente para varios tipos de microalgas (Ramírez-López, et al., 2016), en este medio la microalga *Chlorella vulgaris* mostró capacidad de reproducción, Forero Cujíño, et al., (2016) indicaron que esta microalga tiene la capacidad de crecer de forma eficiente cuando existe una alta cantidad de nutrientes como es el caso del MBB. El ANOVA determinó que el nivel de iluminación es un factor que afecta significativamente la densidad celular de la microalga ($p=0.00001$), Ramos & Pizarro, (2018) indicaron que la intensidad luminosa afecta el crecimiento y metabolismo microalgal. El flujo de aire y la interacción Luz*Aire no son significativos con valores de $p=0.061$ y $p=0.337$ respectivamente. La Figura 9a indica que el factor A (Luz) es significativo y en la gráfica de efectos principales (Figura 9b), se observa que a mayor intensidad de luz mayor densidad celular (1.5×10^6 células/ μL de MBB), esto coincide con Benavente-Valdés, et al., (2016) quienes indicaron que el crecimiento fotosintético es afectado por la intensidad de luz. Sin embargo, es necesario controlar este parámetro y no sobrepasar el punto de saturación de la luz dado que de acuerdo con lo expuesto Ramos & Pizarro, (2018) se podría alcanzar un punto de fotoinhibición lo que podría causar menor eficiencia fotosintética y pérdida de la productividad del cultivo.

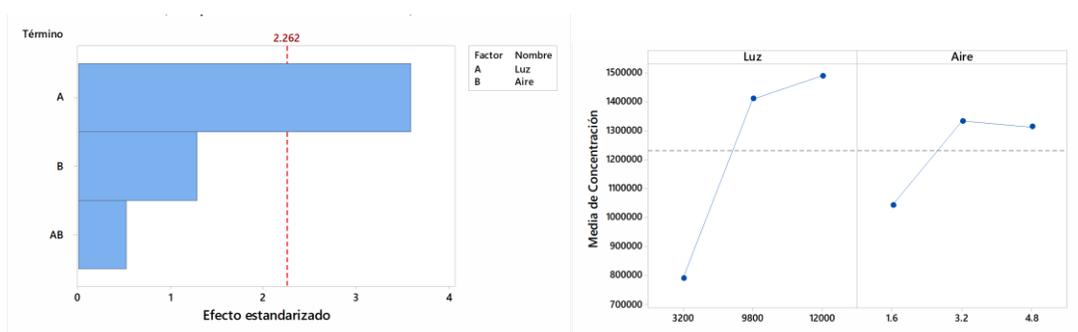


Figura 9 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para densidad celular y b) gráfica de efectos principales para densidad celular

De acuerdo con la gráfica de interacciones (Figura 10) se determinó que con el factor aire a 3.2 y 4.8 L/min y con una intensidad de luz de 12000 lux se pueden obtener resultados similares de crecimiento celular (1.6×10^6 cel/mL). La cinética que mayor crecimiento celular

obtuvo fue en condiciones de 12000 lux y con un flujo de aire de 4.8 L/min, iniciando con una concentración celular de 1.96×10^5 hasta 1.54×10^6 cel/mL en 16 días. Tejada Benítez, et al., (2015) obtuvieron un crecimiento celular de 1.15×10^6 cel/mL de la microalga *Dunaliella salina* con un pH de 8.5 y limitaciones de nitrógeno.

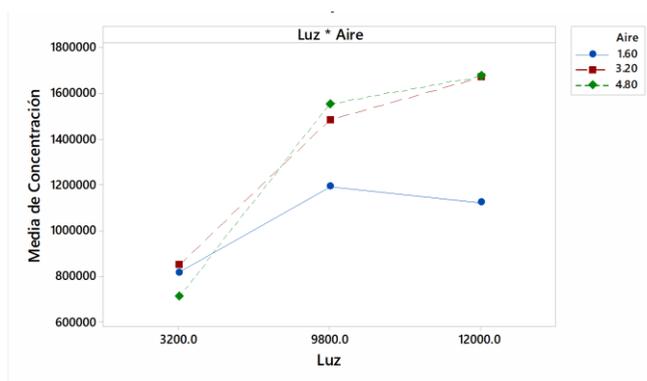


Figura 10 Gráfica de interacciones para densidad celular de microalga *Chlorella vulgaris* en MBB

En la Figura 11 se observa el modelo matemático de crecimiento microbiano de Gompertz, con $R^2 = 0.9845$ y modelo logístico con $R^2 = 0.9705$, dichos modelos permiten realizar una secuencia de la cinética de crecimiento con respecto al tiempo del cultivo, siendo el más adecuado el modelo de Gompertz, este modelo ha sido utilizado por otros autores para simular el crecimiento microbiano en condiciones homogéneas (Zhang, et al., 2020).

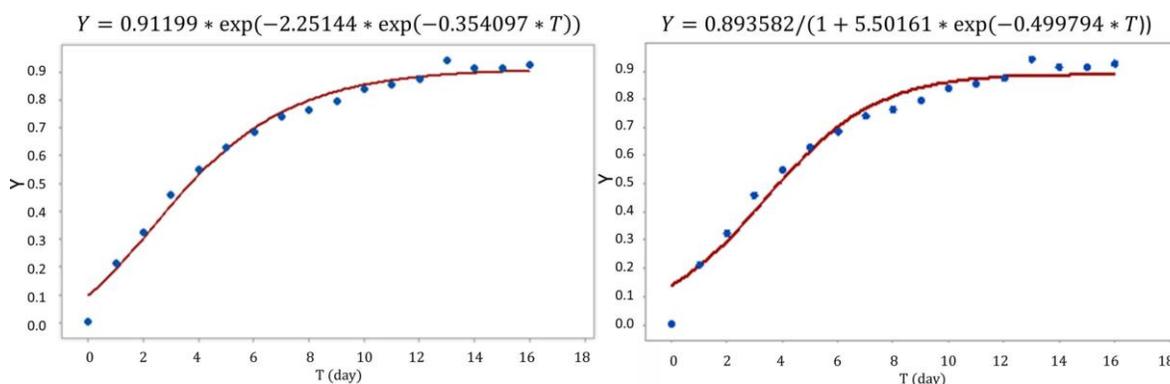


Figura 11 Gráfica línea ajustada Modelo de Gompertz y logístico para crecimiento de microalga *Chlorella vulgaris* en MBB.

4.2. Evaluación de la producción de biomasa por peso seco de la microalga *Chlorella vulgaris* en MBB

El ANOVA indicó que todos los factores son significativos, luz con $p=0$, interacción con $p=0.004$, el aire tiene mayor influencia en el incremento de biomasa con un valor de $p=0.002$. En la Figura 12 se observan, el factor aire tiene mayor impacto en la producción de biomasa dado que las microalgas son microorganismos fotosintéticos que requieren de la fijación de CO_2 , el cual es suministrado por el flujo de aire (4.8 L/min se obtuvieron 3.1033 ± 0.0448 g/L). La intensidad de luz es indispensable para la fotosíntesis, esto se refleja en la producción de biomasa.

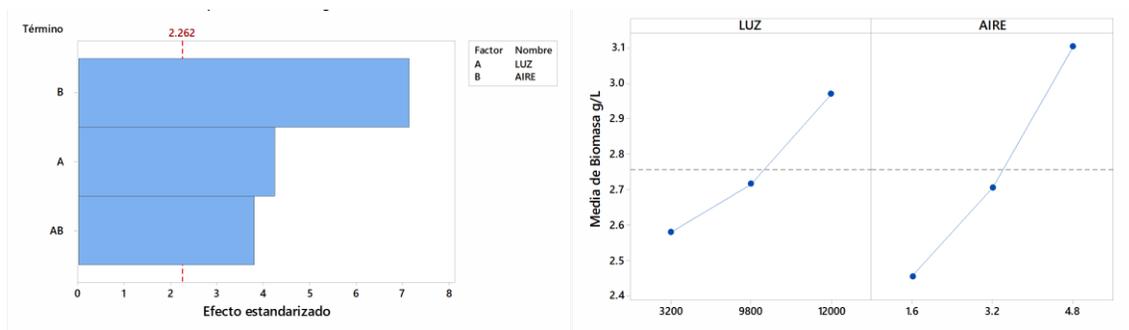


Figura 12 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para biomasa y gráfica de efectos principales para biomasa en MBB

De acuerdo con la gráfica de interacciones (Figura 13) la interacción luz (12000 lux) y aire (4.8 L/min) al igual que la interacción luz (9800 lux) y aire (4.8 L/min) no presentan diferencias en la producción de biomasa, dado que ambos presentan producción de biomasa de 3.38 ± 0.0448 g/L, es decir, con flujo de aire a 4.8 L/min con ambas intensidades de luz se obtienen resultados similares en la producción de biomasa.

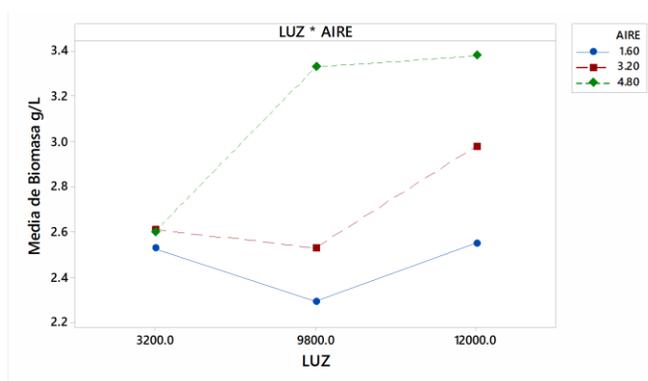


Figura 13 Gráfica de interacciones para biomasa en MBB

4.3 Análisis del comportamiento de la temperatura y pH durante la cinética de crecimiento en MBB

La temperatura de los experimentos se mantuvo en condiciones adecuadas para el crecimiento de la microalga que va de 25 a 35 °C. A temperaturas menores de 16 °C el crecimiento celular disminuye, y a temperaturas mayores de 35 °C resulta ser letal para la gran mayoría de especies de microalgas (Zhang , et al., 2015). Por otro lado, el pH en todos los experimentos cambió de neutro a alcalino con la edad del cultivo, el pH inicial fue de 7 ± 0.2 el cual se incrementó a partir del segundo día de cultivo, esto se debe al incremento celular de la microalga. Es importante mencionar que en todos los experimentos el pH se mantuvo entre los valores permisibles (7 y 9) para la microalga *Chlorella vulgaris*.

4.4 Evaluación del efecto de la luz y aire en la producción de proteínas en MBB

El ANOVA indicó que el factor luz es significativo en la producción de proteínas ($p = 0.0003$), el factor aire ($p=0.0178$) y la interacción Luz*Aire ($p=0.0011$) son significativos. La Figura 14 señala que conforme aumenta la intensidad de luz la cantidad de proteínas aumenta, por lo que con 12000 lux se obtuvo un valor de 200 ± 23.9 mg/L y con un flujo de aire a 4.8 L/min se obtiene una producción de 180 ± 23.9 mg/L.

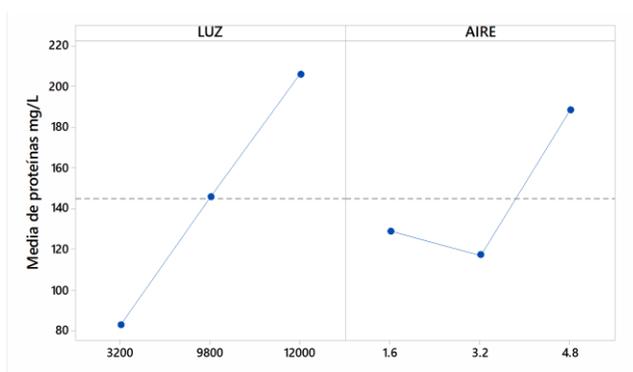


Figura 14 Gráfica de efectos principales para proteínas en MBB.

La Figura 15 denotan que para obtener mayores niveles de producción de proteínas se recomienda utilizar la combinación intensidad de luz de 12000 lux con un flujo de aire de 4.8 L/min alcanzando una producción de hasta 350 ± 33.8 mg/L, debido al alto nivel de

intensidad luminosa. Los resultados obtenidos son mayores a los reportados por (Chinnasamy, et al., 2009) quien obtuvo 96 $\mu\text{g/mL}$ (96 mg/L) en un cultivo con la microalga *Chlorella vulgaris* con diferentes concentraciones de CO_2 (6%).

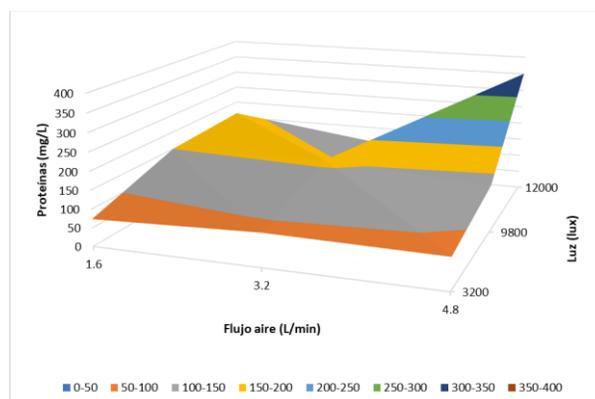


Figura 15 Gráfica de superficie para la producción de proteínas en MBB

4.5 Análisis de la producción de carbohidratos en MBB

El ANOVA determinó que la intensidad de luz ($p=0.185$), el flujo de aire ($p=0.496$) y la interacción Luz*Aire ($p=0.966$) no son significativos para la producción de carbohidratos con valores superiores a 0.05. En el driagrama de Pareto (Figura 16a) se muestra que la luz es el factor con mayor efecto. La Figura 16b indica que la intensidad de 9800 lux produjo la mayor cantidad de carbohidratos (312.25 mg/L \pm 43.8 mg/L), el flujo de aire con mayor producción fue de 1.6 L/min (317.88 mg/L \pm 43.8 mg/L).

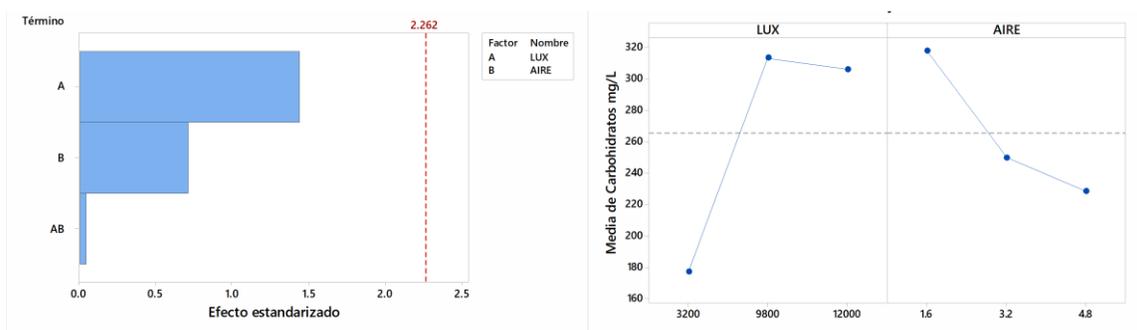


Figura 16 a) Gráfica de Pareto de efectos estandarizados para carbohidratos y b) gráfica de efectos principales para carbohidratos en MBB.

En la gráfica de superficie (Figura 17) se puede observar que para producir mayores cantidades de carbohidratos es recomendable utilizar una iluminación de 12000 lux o 9800 lux. Con 9800 lux y flujo de aire de 1.6 L/min se obtuvo un valor de 381.19 mg/L mientras que a 12000 lux con 3.2 L/min de aire se obtuvieron 324.98 mg/L de carbohidratos. Chinnasamy, et al., (2009) obtuvo 150 mg/L de carbohidratos al evaluar el incremento de biomasa en un cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* en aguas residuales bajo niveles elevados de temperatura (40 °C) y CO₂ (6 %).

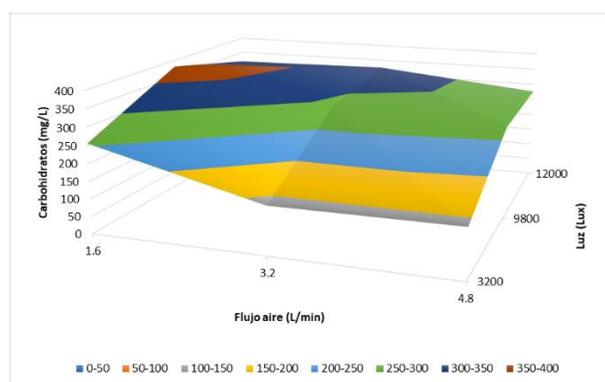


Figura 17 Gráfica de superficie para la producción de carbohidratos en MBB

4.6 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos en MBB

En esta sección se muestran los resultados obtenidos para la determinación de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totales y *carotenos*), donde se muestra que factores influyeron en la producción de clorofilas.

4.6.1 Evaluación de la clorofila *a* en microalga *Chlorella vulgaris* en MBB

El ANOVA mostró que la intensidad de luz y el flujo de aire son significativos para la producción de clorofila *a* obteniendo un valor de $p=0.00001$ y $p=0.00003$ respectivamente. La interacción Luz*Aire también fue significativa ($p=0.0005$). La intensidad de luz de 12000 lux de acuerdo con la gráfica de efectos principales (Figura 18) es la que tuvo una mayor producción de clorofila *a* ($1.997 \pm 0.227 \mu\text{g/mL}$). Es decir, a mayor intensidad luminosa mayor producción de clorofila *a*. El flujo de aire tuvo un comportamiento similar ya que al aumentar el flujo la producción de clorofila *a* se elevó por lo que a 4.8 L/min a $2.1626 \pm 0.227 \mu\text{g/mL}$.

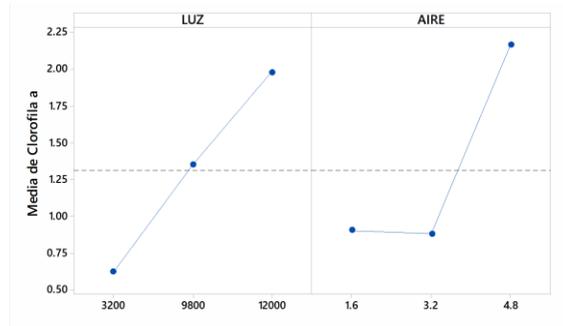


Figura 18 Gráfica de efectos principales para clorofila *a* en MBB.

La Figura 19 muestra que con 12000 lux y un flujo de aire de 4.8 L/min se registró la mayor cantidad de clorofila *a* ($3.8615 \pm 0.322 \mu\text{g/mL}$) similar a los valores obtenidos por Yun-Ming, et al., (2013) de $3.930 \pm 0.187 \mu\text{g/mL}$ en un cultivo de microalgas *C. sorokiniana* en medio sintético BG-11 en fase estacionaria.

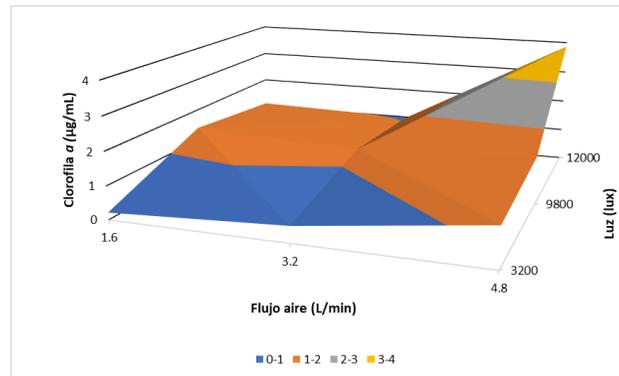


Figura 19 Gráfica de superficie para la producción de clorofila *a* en MBB

4.6.2. Evaluación de la clorofila *b* en microalga *Chlorella vulgaris* en MBB

En la producción de clorofila *b* el ANOVA indicó que todos los factores son significativos (Luz con $p=4.3 \times 10^{-8}$, luz-aire con $p=1.8 \times 10^{-7}$, aire con $p=3 \times 10^{-7}$). De acuerdo con la gráfica de efectos principales (Figura 20) se puede observar que con niveles altos de intensidad luminosa (12000 lux) se obtuvo una mayor producción de clorofila *b* ($1.2464 \pm 0.066 \mu\text{g/mL}$), en caso del flujo de aire también se incrementó la producción de clorofila *b* con niveles superiores, para un flujo 4.8 L/min se alcanzó una producción de $1.42052 \pm 0.066 \mu\text{g/mL}$.

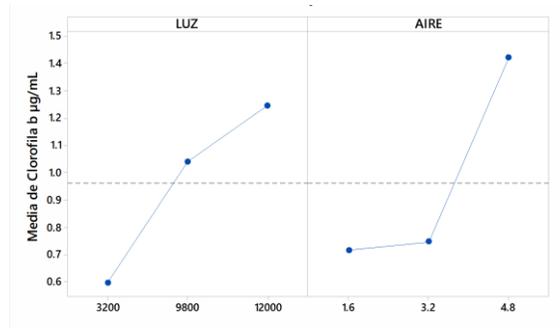


Figura 20 Gráfica de efectos principales para clorofila b en MBB.

En la gráfica de superficie (Figura 21) se muestra que para una alta producción de clorofila b son necesarios altos niveles de iluminación (12000 lux) y de flujo de aire (4.8 L/min) obteniendo un valor de $2.1723 \pm 0.093 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados son similares a los reportados por Chol-Jin, et al., (2019) quienes obtuvieron un contenido de clorofila b de $2.02 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo BG-11 con la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de NaCl.

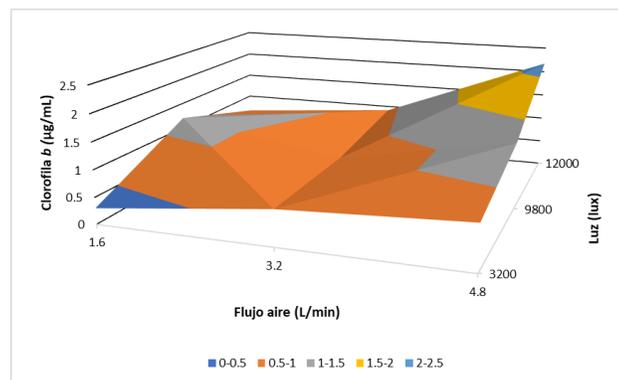


Figura 21 Gráfica de superficie para la producción de clorofila b en MBB

4.6.3. Evaluación de carotenos en microalga *Chlorella vulgaris* en MBB

El ANOVA determinó que la intensidad de luz, el flujo de aire y la interacción Luz*Aire no son significativos obteniendo un valor de $p= 0.447$. En la Figura 22a se muestra el diagrama de Pareto en el cual se observó que a pesar de que ningún factor es significativo, la intensidad de luz es el factor que más influencia tiene en la producción de carotenos. En la gráfica de efectos principales (Figura 22 b) se observa que a una iluminación de 12000 lux se produjeron

mayores cantidades de carotenos ($0.5926 \pm 0.339 \mu\text{g/mL}$), en el caso del flujo de aire el que mayor rendimiento obtuvo para la producción de carotenos fue el de 4.8 L/min ($0.604 \pm 0.339 \mu\text{g/mL}$).

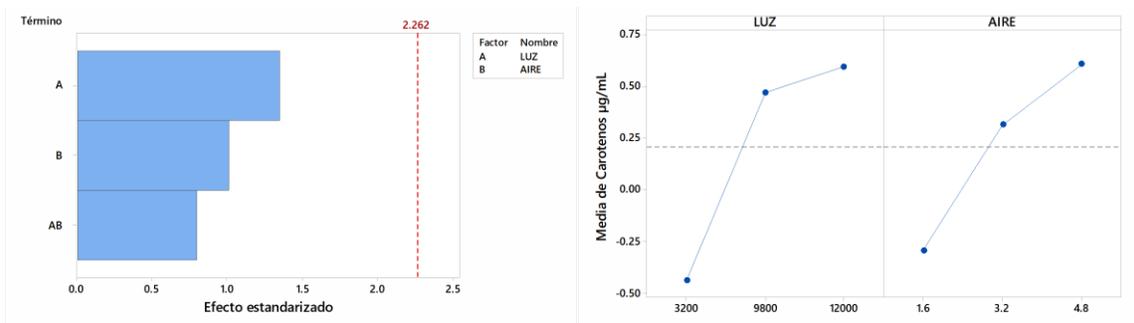


Figura 22 a) Gráfica de Pareto de efectos estandarizados para carotenos y b) gráfica de efectos principales para carotenos en MBB.

La gráfica de superficie (Figura 23) muestra que para producir mayores cantidades de carotenos es recomendable utilizar una iluminación de 12000 lux y 4.8 L/min de flujo de aire obteniendo $1.082 \pm 0.479 \mu\text{g/mL}$

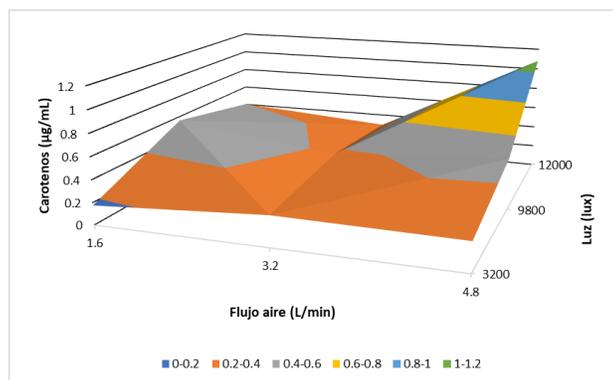


Figura 23 Gráfica de superficie para la producción de carotenos en MBB

4.7 Evaluación del efecto de intensidad de luz y de aire en los lípidos producidos por la microalga *Chlorella vulgaris* en MBB.

Se determinó mediante el ANOVA que la intensidad de luz es un factor significativo ($p=1 \times 10^{-7}$), así como la interacción Luz*Aire ($p=0.0018$) mientras que el factor flujo de aire ($p=0.102$) no son significativos para la producción de lípidos teniendo un valor de $p > 0.05$. En la Figura 24 la gráfica de efectos principales para la extracción de lípidos se observa que

con alta iluminación se pueden producir mayores cantidades de lípidos (11.25 g/100 g biomasa).

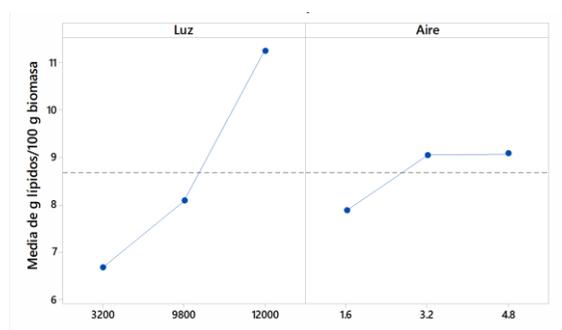


Figura 24 Gráfica de efectos principales para lípidos en MBB

La Figura 25 indicó que para una mayor producción de lípidos es recomendable utilizar 12000 lux con un flujo de aire de 4.8 L/min o 3.2 L/min alcanzando valores de 12.42 ± 0.728 g/100 g biomasa. Converte, et al., (2009) midió el contenido de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* en MBB obteniendo un valor de 11.32 ± 0.20 g/100 g biomasa, en comparación con este trabajo la producción fue ligeramente superior.

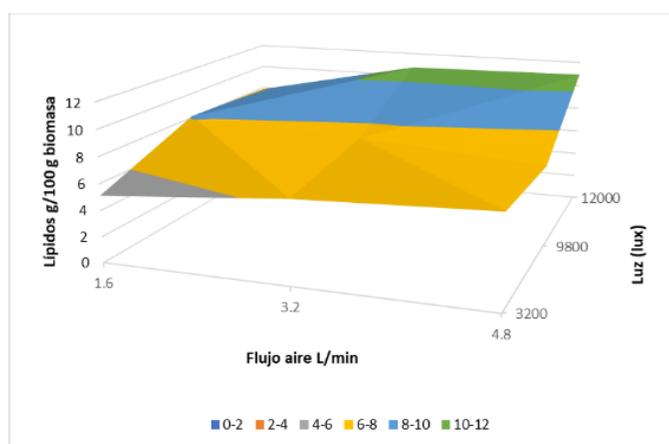


Figura 25 Gráfica de superficie para la producción de lípidos en MBB

4.8 Evaluación de las características fisicoquímicas del agua residual de una industria avícola

El agua residual avícola utilizada como medio de cultivo para la microalga *Chlorella vulgaris* tiene las características fisicoquímicas mostradas en la Tabla 14, el pH con un valor promedio de 6.98 el cual se encuentra dentro del rango de 6.5 a 8.5 establecido en PROY-NOM-001-

SEMARNAT-2017, (2018) y también cumple con NOM-CCA-022-ECOL/1993, (1993) que va de 6 a 9, la temperatura cumple con el límite máximo permisible 40°C establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996, (1996). El agua residual de la industria avícola no cumple con los Criterios Ecológicos de Calidad de Aguas en el cual se establece que para la protección a la vida acuática el oxígeno disuelto debe ser superior a 5 mg/L y que la concentración de nitritos debe ser máximo de 0.002 mg/L, la concentración de nitritos tampoco cumple los límites para fuentes de abastecimiento de agua potable establecidos en estos mismos criterios ya que el valor máximo permisible es de 0.05 (CE-CCA-001-89, 1989). La turbidez del agua residual no cumple con la NOM-127-SSA1-1994, (1999), por lo que es necesario la aplicación de un tratamiento adicional ya que esta agua residual no cumple con los límites máximos permisibles establecidos en la normatividad mexicana.

Tabla 14 Caracterización fisicoquímica del agua residual de la industria avícola

Parámetro	Valor promedio	Límite permisible
pH	6.98 ± 0.0740	6.5-8.5 (PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, 2018) 6-9 (NOM-CCA-022-ECOL/1993, 1993)
Temperatura (°C)	27.25 ± 0.969	40 (NOM-001-SEMARNAT-1996)
Oxígeno disuelto (mg/L)	0.88 ± 0.4645	>5 (CE-CCA-001-89, 1989)
Turbidez (NTU)	87 ± 34.58	<5 (NOM-127-SSA1-1994, 1999)
DQO (mg/L)	1397 ± 595.25	Clasificada como fuertemente contaminada DQO>200 mg/L Para ríos, arroyos, canales, drenes: Valor Instantáneo ≤ 210 Promedio Mensual ≤ 150 Promedio Diario ≤ 180 (PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, 2018)
Fósforo total (mg/L)	11.97 ± 1.41	Para ríos, arroyos, canales, drenes: Valor Instantáneo ≤21 Promedio Mensual ≤15 Promedio Diario ≤18 (PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, 2018)
Nitritos (mg/L)	0.197 ± 0.038	≤0.002 para protección a la vida acuática ≤0.05 para fuentes de abastecimiento de agua potable (CE-CCA-001-89, 1989)
Nitratos (mg/L)	0.068 ± 0.002	≤0.04 para protección a la vida acuática
ST (mg/L)	1073 ± 305.15	1000
SS (mg/L)	828 ± 680.15	200
STV (mg/L)	637 ±150.31	

El agua residual no contiene metales pesados, los valores obtenidos fueron cobre (0.019 mg/L), hierro (0.3551 mg/L), zinc (0.076 mg/L), y manganeso (0.049 mg/L) y poco o nada de níquel, cromo, cobalto (no detectado < 0.001 mg/L) y arsénico (0.0035 mg/L).

4.9 Resultados obtenidos en la fase de adaptación de la microalga *Chlorella vulgaris* a agua residual de una industria avícola

La fase de adaptación permitió evaluar la aclimatación de la microalga *Chlorella vulgaris* para su reproducción en agua residual de la industria avícola, se encontró que al utilizar *Chlorella vulgaris* previamente cultivada en MBB (cultivo principalmente inorgánico), la adaptación fue favorable en este medio de cultivo orgánico, por lo que el agua residual industrial es un recurso prometedor en la producción de microalgas las cuales pueden emplearse como materia prima para la producción de biocombustibles (Chinnasamy, et al., 2010), Ayatollahi, et al., (2020) indicó que la microalga *Chlorella vulgaris* ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de agua residual municipal y para la producción de biodiésel. En la Figura 26, se pueden observar 4 fases; la fase de adaptación (fase 1) correspondiente a los primeros 3 días con un incremento mínimo celular de 1.18×10^5 a 1.82×10^5 células/mL ARIA, la fase de crecimiento exponencial (fase 2) con un incremento de las células/mL en un 669.23% en 10 días con un valor final de 1.4×10^6 células/mL. Finalmente, se presentó la fase estacionaria (fase 3) a partir del día 14 en la cual la velocidad de crecimiento disminuyó.

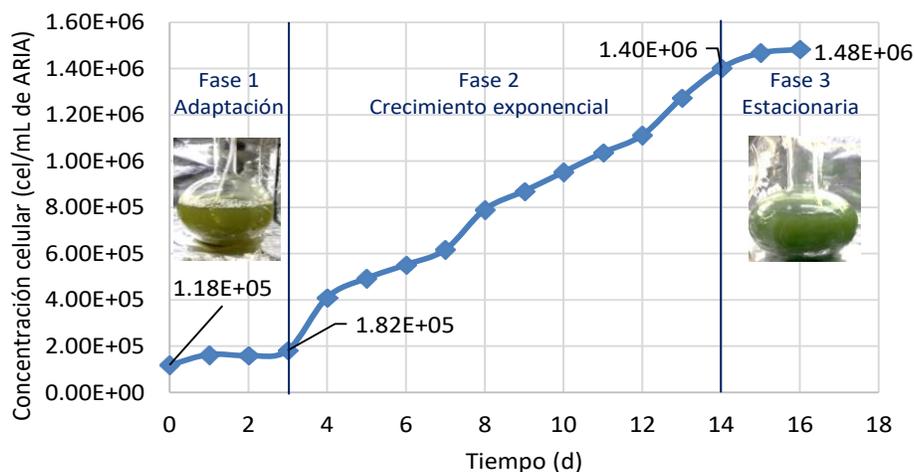


Figura 26 Cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en adaptación

4.10 Evaluación de la densidad celular de *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola

El análisis de varianza permitió determinar que el factor luz ($p=0$) y la interacción Luz*DQO ($p=0.020$) tiene un efecto significativo sobre la densidad celular de la *Chlorella vulgaris*. Por otro lado, se encontró que la DQO no tiene un efecto significativo con valor de $p=0.370$ respectivamente, esto indica que la concentración de materia orgánica no altera el crecimiento de la microalga, dado que la demanda química de oxígeno no es necesaria para realizar el proceso de fotosíntesis. En la Figura 27a se observa que la luz tiene un alto impacto en el crecimiento la microalga *Chlorella vulgaris*, esto se debe a que este factor afecta la fisiología de las microalgas, además la microalga es un organismo fotosintético que requiere de energía luminosa para poder llevar a cabo sus actividades metabólicas (Benavente-Valdés, et al., 2016). En la gráfica de efectos principales Figura 27b al igual que en MBB se observa que a mayor intensidad de luz (lux) mayor densidad celular 8×10^5 células/mL de ARIA.

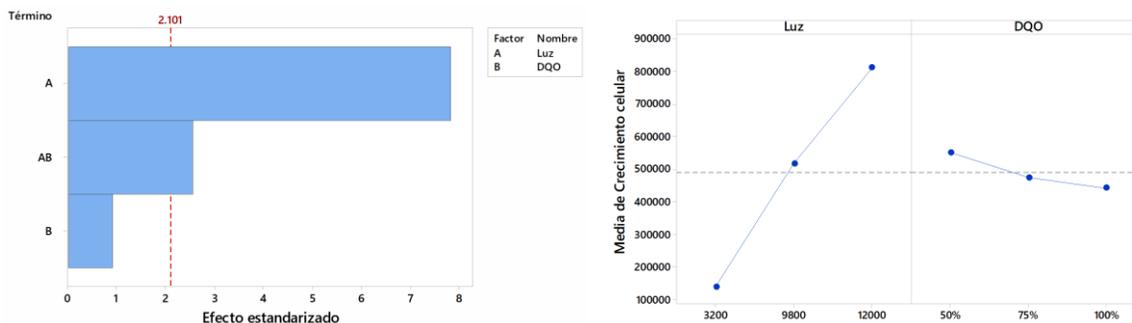


Figura 27 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y b) gráfica de efectos principales para densidad celular con Agua Residual de la Industria Avícola (ARIA)

Al analizar la interacción de los factores luz y DQO (Figura 28) se encontró que con un nivel alto de intensidad luminosa y con una concentración alta de DQO se obtiene menor crecimiento celular que cuando se utiliza un alto nivel de intensidad de luz y una DQO con 50% de ARIA, esto se debe a que las aguas residuales tienen una composición fisicoquímica compleja, y los nutrientes que la microalga necesita para su crecimiento podrían ser escasos, además es posible la existencia de inhibidores para su crecimiento, dando como resultado un crecimiento deficiente de la microalga (Malvis, et al., 2019), al compararlo con el medio Bold Basal (MBB) el cual cuenta con macronutrientes como NaNO_2 , MgSO_4 , NaCl , K_2HPO_4 entre otros y micronutrientes como MoO_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ entre otros (Ardilla

Álvarez, et al., 2017). Altas concentraciones de DQO afectan la turbidez lo que dificulta que la microalga reciba la misma intensidad de luz, este fenómeno también se ha presentado en otros tipos de aguas, por ejemplo; en las aguas residuales recalcitrantes (Valderrama, et al., 2002) se encontró que el color oscuro del agua que contiene altos niveles de materia orgánica impidieron el crecimiento, por tal motivo utilizaron una dilución al 10 % de la concentración. Sin embargo, es importante destacar que en la presente investigación se encontró que las máximas concentraciones de DQO del agua residual avícola no afectan significativamente el crecimiento celular, lo cual la hace viable como medio de cultivo para la producción de *Chlorella vulgaris*.

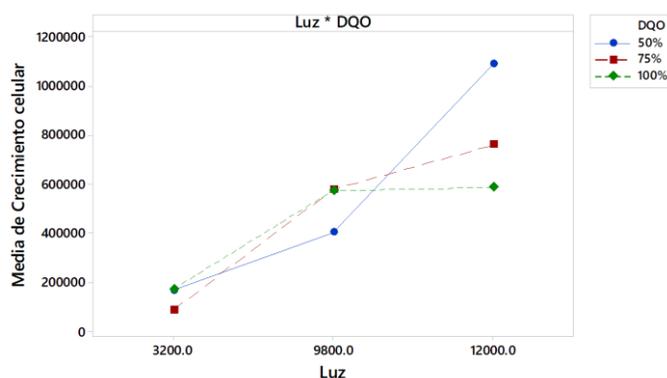


Figura 28 Gráfica de interacciones de crecimiento celular de microalga *Chlorella vulgaris* en ARIA

En la Figura 29 se muestra el comportamiento de la DQO y el crecimiento de la microalga con respecto al tiempo para una intensidad de luz de 12000 lux y 100% de DQO equivalente a 1261 ± 423.061 mg/L inoculada con $1.55 \times 10^5 \pm 56568$ células/mL de ARIA, la concentración final fue de 5.85×10^5 células/mL de ARIA obteniendo un incremento celular de 377.41%. Es importante destacar que el incremento celular fue superior a cuando se utiliza agua residual de la PTAR salitre en esta agua (Sandoval Herrera, et al., 2018) obtuvo únicamente un incremento celular de 236.36%. La *Chlorella vulgaris* se adaptó y pero tuvo menor incremento celular que la microalga *Scenedesmus sp.*, en agua residual de pescadería (1×10^6 cel/mL – 8.05×10^6 cel/mL dando un incremento de 805 %) de acuerdo con el estudio realizado por Andrade R., et al., (2009). En la Figura 29 se observa que la fase de adaptación de la microalga fue de 2 días, durante estos 2 días las microalgas y los microorganismos

(bacterias y/o hongos) presentes en el agua residual realizaron la remoción acelerada de la DQO. Una vez que la disponibilidad de materia orgánica disminuyó se presentó una fase de crecimiento exponencial con una duración de 10 días. Es importante mencionar que durante la fase estacionaria la DQO se incrementó, lo cual puede deberse a la lisis celular.

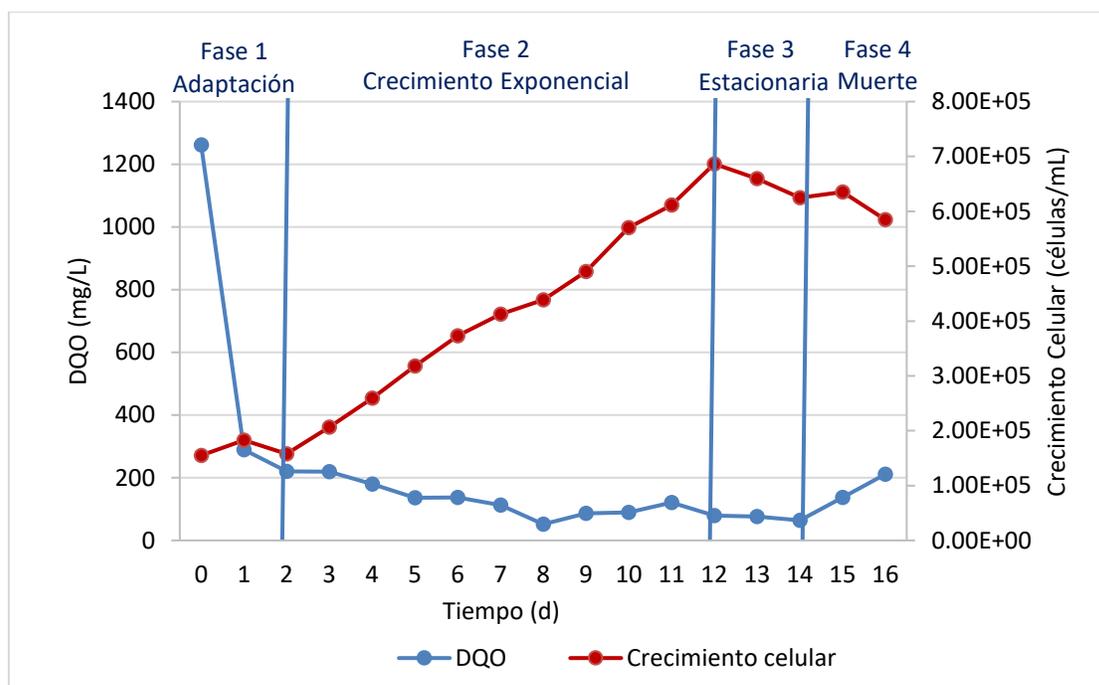


Figura 29 Curva de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* con las condiciones de 12000 lux y 100% DQO (1261.85 ± 426.061 mg/L)

La remoción promedio de DQO con 12000 lux y 1261.85 mg/L de DQO fue del 93.74%, superior a la obtenida por Sandoval Herrera, et al., (2018) de 81.80% en agua residual urbana empleando *Chlorella vulgaris*, previamente adaptada. Los resultados también superan los porcentajes obtenidos por Andrade R., et al., (2009) de 35.59 % de remoción para agua residual de pescadería con la microalga *Scenedesmus sp.* Las microalgas se han empleado con éxito en diferentes efluentes, de Mendonça, et al., (2018) utilizó agua residual de ganado en las que obtuvo porcentajes de remoción de DQO de 65% y 70% en operación por lotes y de 57% y 61% en continuo utilizando microalgas de la especie *Scenedesmus obliquus*.

Al comparar el tratamiento realizado con *Chlorella vulgaris* con otros tratamientos se encontró que el porcentaje de remoción de DQO fue superior a la obtenida en la cámara de cloración (entrada 80.2 mg/L y salida de 64.4 mg/L) cuyo porcentaje de remoción fue de 19.7 % (Gutierrez, et al., 2012), a pesar de que la remoción en la cloración ocurre en un corto

periodo de tiempo con *Chlorella vulgaris* se alcanzó el 77.06 % de remoción en el primer día de tratamiento. Ayatollahi, et al., (2020) también encontró que en aguas residuales municipales al utilizar *Chlorella vulgaris* la DQO (404.95 ± 7.83 mg/L) disminuye drásticamente en el primer día en sistemas aireados con CO₂ atmosférico, a pesar de que la DQO inicial en el presente trabajo es el triple de la utilizada por (Ayatollahi, et al., 2020).

Las microalgas están asociadas con bacterias, lo cual puede tener un efecto positivo o negativo en el crecimiento (de-Bashan, et al., 2008). Las diferentes actividades metabólicas favorecen la creación de microambientes en los que cada grupo encuentra las condiciones adecuadas a sus necesidades (Corrales, et al., 2015), en este caso el tratamiento del agua residual se llevó a cabo por la acción de las bacterias aerobias (provenientes del tratamiento en la industria avícola) y la microalga *Chlorella vulgaris*. Las bacterias degradaron la materia orgánica carbonácea presente en el agua residual dando lugar al proceso metabólico conocido como catabolismo, dando lugar a CO₂, NH₃ y nuevas células, así como compuestos minerales y energía, como se muestra en la siguiente reacción (Knobelsdorf, 2005)



Benavente-Valdés, et al., (2016) describen que el proceso fotosintético es de importancia en el metabolismo de las microalgas. La mayoría de las microalgas tienen un metabolismo fotoautótrofo, es decir, requieren una fuente de luz y de nutrientes inorgánicos (Beltrán-Rocha, et al., 2017). Por lo que, en este caso la *Chlorella vulgaris* utilizó el CO₂ generado por las bacterias para producir oxígeno, mismo que favoreció las condiciones aeróbicas para las bacterias (Morales Amaral, 2016). En términos generales la energía solar permitió que la microalga metabolizara el dióxido de carbono (CO₂) atmosférico y el obtenido por la remoción de la materia orgánica (MO) liberando oxígeno (O₂) (Beltrán-Rocha, et al., 2017), como se muestra en la siguiente reacción (Abinandan & Shanthakumar, 2015).



En la Figura 30 se observa el modelo matemático de crecimiento microbiano usando la ecuación de Gompertz, se obtuvo un valor de $R^2=0.9904$ y para el modelo logístico $R^2=0.9783$. El modelo de Gompertz presentó el mejor ajuste tanto para medio de cultivo Bold Basal y para el agua residual avícola por lo que es capaz de predecir el crecimiento de

Chlorella vulgaris para estos dos medios de cultivo. Lam, et al., (2017) utilizó el modelo de Gompertz y el logístico obteniendo valores de R^2 de 0.9935 y 0.9880 respectivamente también para *Chlorella vulgaris* pero utilizando aguas residuales domésticas.

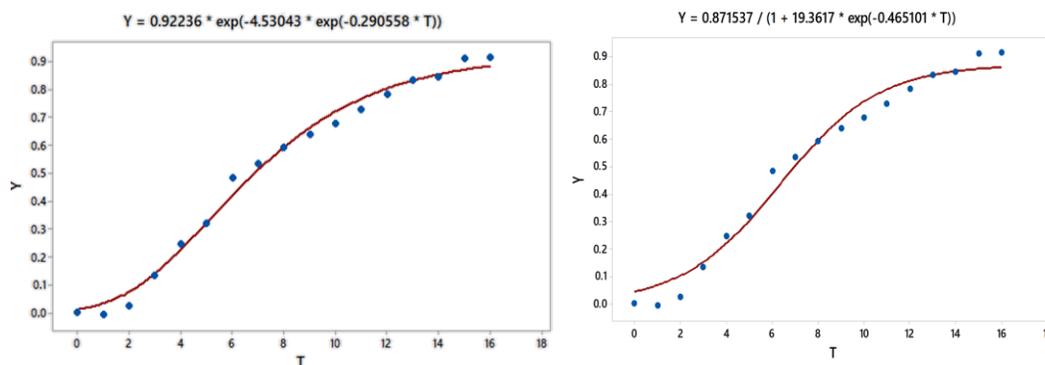
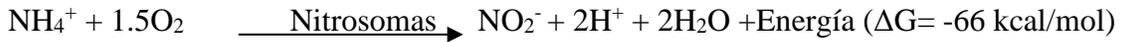


Figura 30 Gráfica línea ajustada modelo de Gompertz y logístico para crecimiento de microalga *Chlorella vulgaris* en ARIA a 12000 lux y DQO de 1261.85±426.061 mg/L.

4.11 Comportamiento del contenido de nitritos durante el tratamiento con *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola

La degradación de la materia orgánica tuvo lugar en los primeros dos días (Figura 31) por lo que se generó CO_2 , parte de éste fue aprovechado por la microalga *Chlorella vulgaris* durante la fotosíntesis dando como resultado un incremento del oxígeno disuelto (en la línea gris de la Figura 31). En las aguas residuales el nitrógeno puede estar presente en forma de nitritos, nitratos y amonio (Abinandan & Shanthakumar, 2015). El agua residual de la industria avícola es un agua residual que contiene desechos biológicos y de acuerdo a (Park, et al., 2013) el agua residual que contiene desechos biológicos de animales está impregnada con abundante nitrógeno y fósforo inorgánicos, por tal razón el oxígeno producido en la fotosíntesis fue fundamental (de Mendonça, et al., 2018) ya que permitió reducir los costos relacionados con la aireación, y de manera adicional favoreció el proceso de nitrificación, la cual se dio en dos etapas; la primera oxidación de amonio a nitritos y la oxidación de nitritos a nitratos (Carrasquero-Ferrer, et al., 2014). Dado que el agua residual avícola proviene de un tratamiento aerobio, las bacterias aerobias presentes permiten que el amonio (NH_4^+) reaccione produciendo una oxidación de los compuestos a nitritos (NO_2^-), esta ruta de

eliminación de nitrógeno es más rápida en comparación con la eliminación vía nitrato, además, la demanda de oxígeno para la nitrificación es menor en un 25% de acuerdo con las siguientes reacciones (Jenicek, et al., 2004)



En la Figura 31 se observa que una vez que el proceso de remoción de carbono termina (día 2), la producción de oxígeno disuelto disminuyó por lo que en el día 3 la velocidad de producción de los nitritos bajó considerablemente. El comportamiento del pH osciló entre 7.3 y 8.3, por lo que el pH se encontró dentro del rango óptimo (7.5 a 8.6 unidades de pH) para la nitrificación (Carrasquero-Ferrer, et al., 2014). Finalmente, como se puede observar el oxígeno disuelto a partir del día 5 volvió a incrementarse ya que las microalgas aprovechan el CO₂ del aire (Azhand, et al., 2020), este incremento de oxígeno favoreció la segunda etapa de la nitrificación en la cual los nitritos se oxidan y se convierten en nitratos (NO₃⁻) (Carrasquero-Ferrer, et al., 2014) (Safi, et al., 2014), por lo que hay un decremento en la concentración de nitritos presente a partir del día 8 dando lugar a la siguiente reacción.

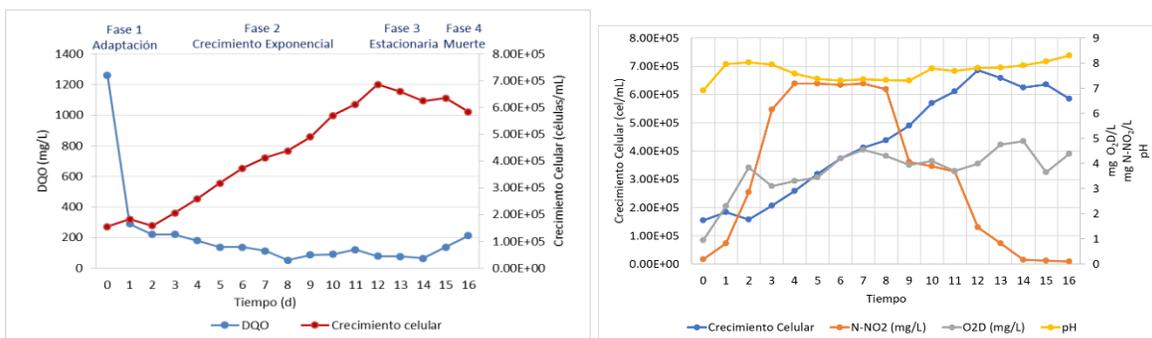


Figura 31 Relación entre el comportamiento de la DQO y crecimiento celular con la producción de oxígeno disuelto y de nitritos en la microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual avícola

4.12 Comportamiento del contenido de fósforo total durante el tratamiento con *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola

El fósforo es un nutriente esencial (Safi, et al., 2014) en la formación de biomasa encontrándose en forma de fosfato en las aguas residuales (Hernández Pérez & Labbé, 2014). La eliminación de este nutriente empleando microalgas es más lenta en comparación con nitrógeno, esto se debe a que las células se saturan con mayor rapidez con fosfato debido a la acumulación de polifosfatos (Ayatollahi, et al., 2020). El mayor porcentaje de remoción de fósforo total se dio en las primeras 48 horas (29.56 % de remoción) tal como lo mencionó (Ayatollahi, et al., 2020).

4.13 Evaluación de biomasa por peso seco de la microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola

El análisis de varianza con un nivel de confiabilidad del 95% permitió determinar que para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* el factor Luz con un valor de $p=0$ es el factor con mayor influencia en la producción de biomasa (Figura 32) y la interacción de Luz*DQO ($p=0.025$) también es significativo. Por otro lado, el factor DQO no es significativo con un valor de p de 0.253. En la Figura 32b se muestra la gráfica de efectos principales, en la que destaca que el factor luz con una intensidad de 12000 lux tuvo la mayor producción de biomasa siendo esta de 1350 ± 50 mg/L de biomasa. La concentración de biomasa con cualquiera de los niveles de 75% y 100 % de DQO permiten producción superior a la media de 1100 mg/L.

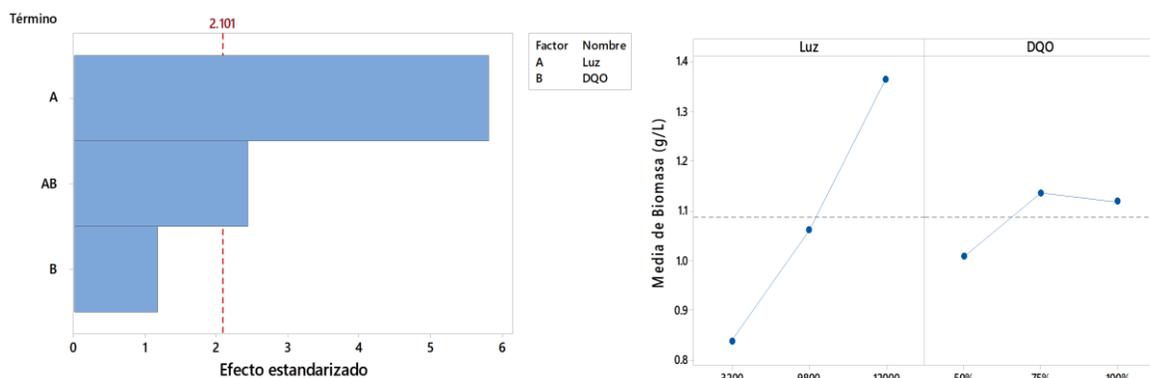


Figura 32 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y gráfica de efectos principales para la producción de biomasa

La gráfica de interacción (Figura 33) muestra que la mayor producción de biomasa se tiene cuando el factor luz es de 12000 lux con una DQO de 75% y de 50% alcanzando los 1480 ± 50 mg/L. También se logra observar cuando la intensidad de luz es baja (3200 lux) independientemente de la concentración de DQO la producción es mínima.

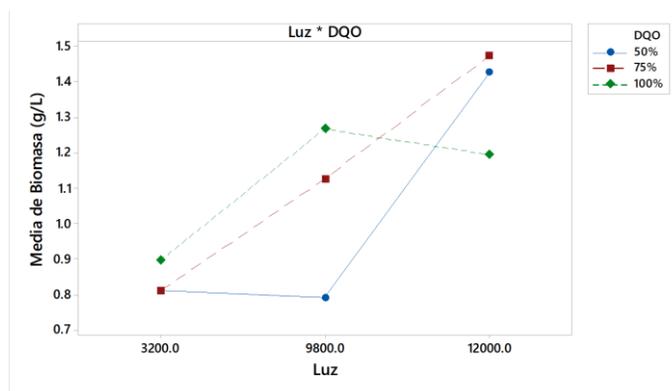


Figura 33 Gráfica de interacción para la producción de biomasa (mg/L)

La producción de biomasa con 12000 lux y 100% de DQO fue de 1.425 ± 0.205 g/L. La producción media de todos los experimentos fue de 1.1 g/L, los valores de biomasa son superiores a los resultados obtenidos por Ramírez-López, et al., (2016) también utilizando *Chlorella vulgaris* pero en medio UTEX 26 con el cual tuvo producciones desde 0.39 g/L hasta 0.61 g/L (día 16) dependiendo de los macronutrientes utilizados, pero similares a los resultados obtenidos por Daneshvar, et al., (2018) que cultivó *Chlorella vulgaris* en agua residual de pulpa + agua de lago con una concentración 40:60, con una concentración final de biomasa de 1.21 g/L.

4.14 Evaluación del efecto de luz y DQO en la producción de proteínas microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola

Al evaluar el efecto que tiene la intensidad de luz y la DQO se encontró mediante el análisis de varianza que la DQO y la interacción luz*DQO no son significativos ya que el valor de p es mayor a 0.05 de 0.102 y 0.136 respectivamente. La intensidad de luz es significativa con un valor de p de 0.020 como se muestra en el diagrama de Pareto de la Figura 34a, esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo en MBB en donde la intensidad

luminosa también fue un factor significativo. En ambos experimentos los mayores resultados de proteínas se obtuvieron a 12000 lux, bajo estas condiciones de luz se obtuvieron 201.61 ± 73.38 mg/L de proteínas utilizando 100 % de DQO. Como se puede observar para una mayor producción de proteínas los mejores resultados se obtendrían a 50% de DQO, sin embargo, al no ser este un factor significativo la variación de este factor no afecta en la producción de proteínas.

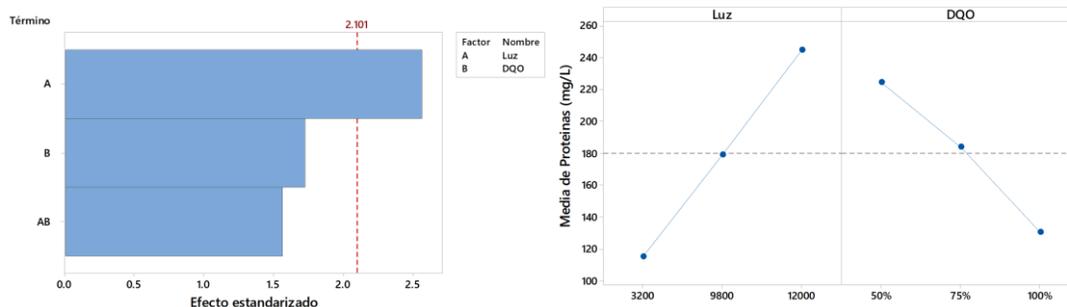


Figura 34 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para proteínas y b) gráfica de efectos principales para proteínas en agua residual industrial avícola

En la gráfica de superficie (Figura 35) se muestra que para obtener la mayor producción de proteínas en la microalga *Chlorella vulgaris* se recomienda utilizar una intensidad de luz de 12000 lux y una DQO de 50% alcanzando un valor máximo de 342 ± 114.1 mg/L, valores muy cercanos a los obtenidos con MBB de 350 ± 33.8 mg/L, los resultados obtenidos en MBB y en agua residual avícola fueron superiores a los obtenidos por Chinnasamy, et al., (2009), donde lograron una producción de $96 \mu\text{g/mL}$ (96 mg/L) a temperatura de 30°C con diferentes concentraciones de CO_2 . De acuerdo con Xiao, et al., (2019) la microalga *Chlorella vulgaris* tiene la capacidad de transformar el nitrógeno amoniacal en proteínas y como se mencionó anteriormente este tipo de agua residual tiene desechos animales lo que la hace rica en nitrógeno inorgánico (Park, et al., 2013). Entre las formas de nitrógeno inorgánico NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- las microalgas prefieren utilizar NH_4^+ como fuente de nitrógeno ya que requiere una menor cantidad de energía ya que no necesita una reacción redox (Beltrán-Rocha, et al., 2017).

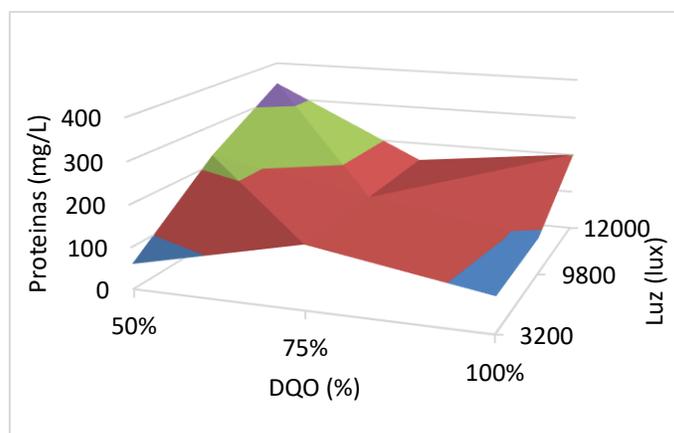


Figura 35 Gráfica de superficie para la producción de proteínas en agua residual de una industria avícola

4.15 Evaluación del efecto de luz y DQO en la producción de carbohidratos de microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual de una industria avícola

El análisis de varianza demostró que el factor DQO no es significativo al obtener valores de p mayores a 0.05 ($p=0.134$). Por otra parte, el factor luz y la interacción luz-DQO si tienen un efecto significativo en la producción de carbohidratos con valores de p de 0 y de 0.005 respectivamente. El factor que tiene mayor impacto en la producción de carbohidratos es la luz como se muestra en el diagrama de Pareto de la Figura 36a. En la Figura 36b se muestra que al incrementar la intensidad luminosa la producción de carbohidratos aumenta, contrario a lo que ocurre con la DQO, ya que a mayor DQO menor producción de carbohidratos, debido a que a mayor concentración de DQO la turbidez del agua residual aumenta, esto impide el paso de luz por lo que la producción de carbohidratos es menor y por eso la interacción luz – DQO es significativa.

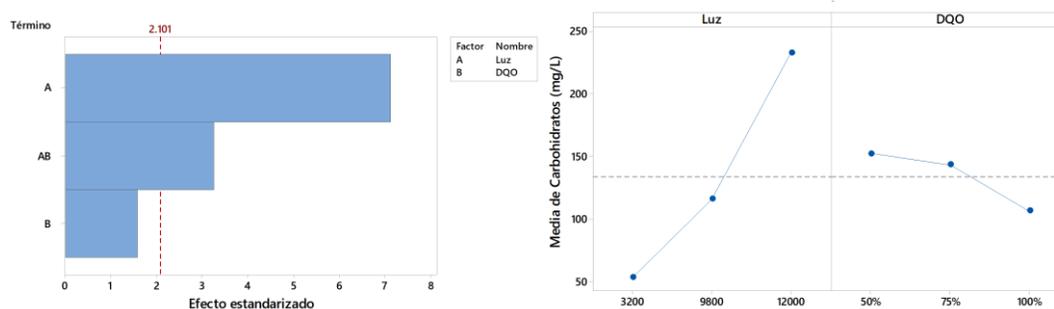


Figura 36 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para carbohidratos y b) gráfica de efectos principales para carbohidratos en agua residual industrial avícola

En la Figura 37 se encuentra la gráfica de interacciones y la gráfica de superficie en las cuales se observa que a 12000 lux y 50% DQO se logra la mayor producción de carbohidratos con un valor de $301 \text{ mg/L} \pm 26.3 \text{ mg/L}$, este valor es inferior al obtenido en este trabajo en MBB con la misma intensidad luminosa (324.98 mg/L), pero mayor a los obtenidos por Chinnasamy, et al.,(2009) el cual fue de $250 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (250 mg/L) utilizando la misma microalga a una temperatura de 30°C y una concentración de CO_2 de 6%.

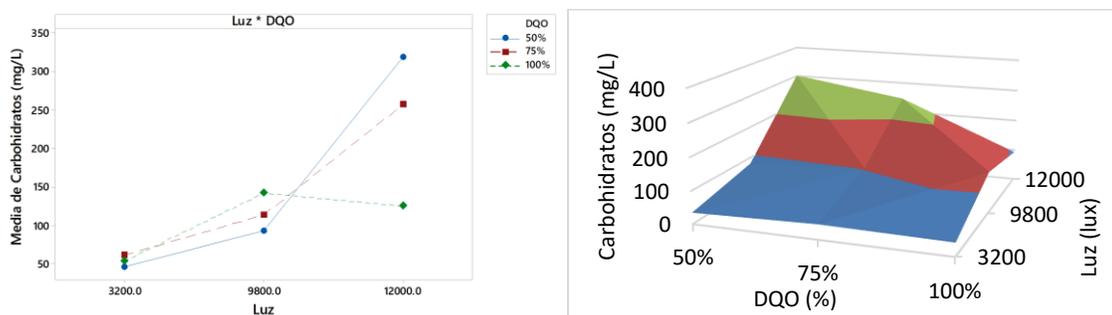


Figura 37 a) Gráfica de interacción y b) gráfico de superficie para la producción de carbohidratos en agua residual industrial avícola

4.16 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos en agua residual de una industria avícola

El contenido de pigmentos fotosintéticos es importante ya que el crecimiento y el desarrollo de los pigmentos está relacionado con la fuente de carbono que los alimenta (Vo, et al., 2020).

4.16.1 Evaluación de la clorofila *a* en microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual industrial avícola

En el análisis de varianza se encontró que el factor luz y la interacción luz*DQO es significativo para la producción de clorofila con un valor de $p=0$ y $p=0.003$ respectivamente con un índice de confiabilidad del 95%. El factor DQO no es significativo en la generación de la clorofila *a* ($p=0.076$). En la Figura 38a se aprecia el diagrama de Pareto, el cual muestra que el factor A (luz) y la interacción AB son significativos en la producción de clorofilas dado el proceso fotosintético. El factor B (DQO) no afecta de manera significativa la producción de clorofila *a*, esto es favorable ya que el agua residual avícola se puede utilizar sin ninguna dilución. En la Figura 38b la gráfica de efectos principales indica que un aumento de intensidad de luz permite alcanzar mayores concentraciones de clorofila *a*, obteniendo la

mayor cantidad de clorofila *a* de 0.857 con 50% de DQO. Utilizando 12000 lux y 100% de DQO se obtiene una producción de clorofila *a* de $0.409 \pm 0.0851 \mu\text{g/mL}$, estos valores son cercanos a los obtenidos por Vo, et al., (2020) los cuales fueron inferiores a 0.5 mg/L empleando 0.1 % salinidad con la microalga *Chlorella sp.*

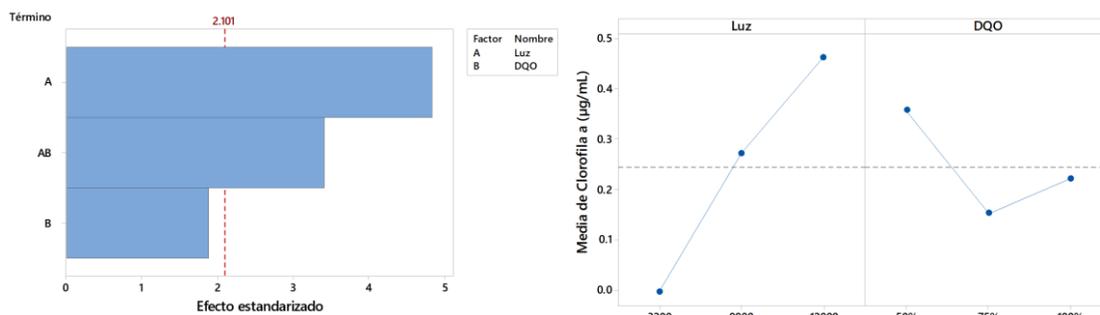


Figura 38 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y gráfica de efectos principales para la producción de clorofila *a* en agua residual de una industria avícola

La Figura 39 muestra que a mayor intensidad de luz y menor concentración de DQO se obtuvo la mayor producción de clorofila *a*, en este caso para una intensidad de luz de 12000 lux y 50% DQO se obtuvo $0.85 \pm 0.167 \text{ mg/L}$. El resultado obtenido de clorofila *a* de $0.85 \mu\text{g/mL}$ es menor al obtenido por Yun Ming, et al., (2013) con *Chlorella sorokiniana C3* en medio BG11 el cual fue de $5.402 \pm 0.539 \mu\text{g/mL}$ con condiciones limitantes de nitrógeno y de $8.324 \pm 0.773 \mu\text{g/mL}$ sin limitación de nitrógeno.

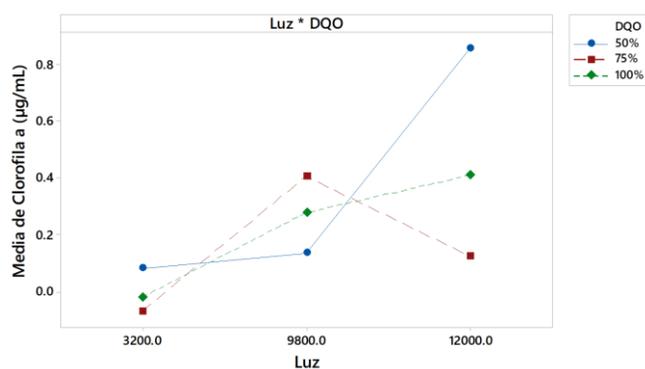


Figura 39 Gráfica de interacciones para la producción de Clorofila *a*

4.16.2 Evaluación de la clorofila *b* en microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual industrial avícola

El análisis de varianza (IC 95%) indicó que el factor luz y el factor DQO por sí solos no son significativos para la producción de clorofila *b* con valores de *p* de 0.228 y de 0.715 respectivamente. Sin embargo, la interacción luz DQO tiene un efecto significativo al producir clorofila *b* (*p*=0.032), esto también se puede observar en la Figura 40a. La producción de clorofila *b* es mayor cuando se incrementa la cantidad de luz y de DQO tal como se puede observar en la Figura 40b.

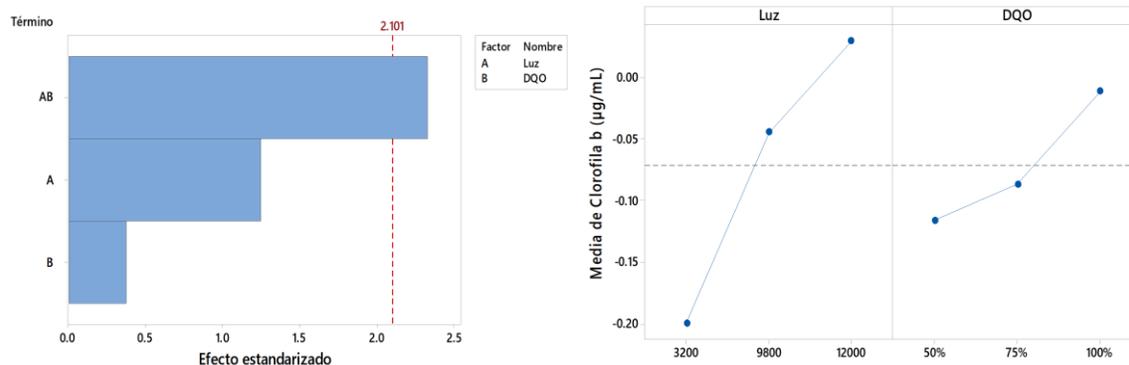


Figura 40 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y b) gráfica de efectos principales para la producción de clorofila *b*

La Figura 41 muestra que la mayor producción de clorofila *b* fue de 0.34 ± 0.004 µg/mL con la combinación de 12000 lux y 50% DQO. El resultado obtenido es menor al obtenido por Yun Ming, et al., (2013) el cual utilizó la microalga *Chlorella sorokiniana* C3 en un medio BG11 en donde obtuvo cantidades de 1.496 ± 0.247 µg/mL con limitación de nitrógeno y 2.894 ± 0.029 µg/mL sin limitación de nitrógeno, la microalga *Chlorella vulgaris* produce menor cantidad de clorofila *b* en agua residual industrial avícola, sin embargo, esta misma microalga a 12000 lux obtuvo valores de 2.172 ± 0.093 µg/mL en medio Bold Basal.

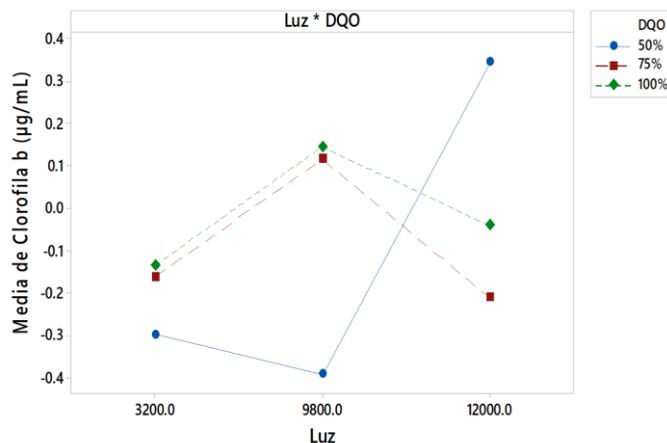


Figura 41 Gráfica de interacción para la producción de clorofila *b*

4.17 Evaluación del efecto de intensidad de luz y DQO en la producción de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* con agua residual avícola

Al realizar el análisis de varianza se encontró que los dos factores; luz con $p=0.001$ y DQO con $p=0.003$, y la interacción luz*DQO con $p=0.001$ son significativas al tener un valor p menor a 0.05, sin embargo, el factor que puede influir más en la producción de lípidos es el factor luz. En la Figura 42a el diagrama de Pareto indica que la intensidad de luz, la DQO utilizada y la interacción entre estos factores afectan de manera considerable la producción de lípidos. En la Figura 42b se muestra que a mayor intensidad de luz la producción de lípidos aumentó, con una intensidad de 12000 lux se puede obtener una cantidad promedio de 5.3 ± 1.73 g lípidos/100 g biomasa, al utilizar una DQO de 100% se produce en promedio 5 ± 2.13 g lípidos/100 g biomasa estos valores sobre pasan la media mostrada.

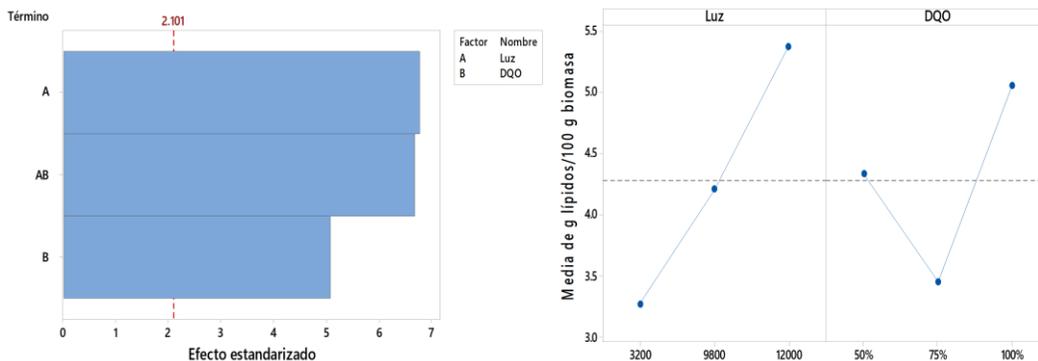


Figura 42 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados y b) gráfica de efectos principales para la generación de lípidos con *Chlorella vulgaris* en agua residual avícola

En la gráfica de interacciones y en la de superficie Figura 43 se observa que para obtener la mayor cantidad de lípidos se recomienda utilizar una intensidad de luz de 12000 lux y una DQO de 100% obteniéndose en promedio 7.3 ± 1.62 g lípidos/100 g biomasa, estos resultados son menores que los obtenidos por Herrera Yañez, (2017) de 16.10 g lípidos/100 g biomasa trabajando con el Medio de cultivo Bold Basal (MBB) empleando la *Chlorella vulgaris* y también fue menor a la obtenida al emplear MBB en este trabajo (12.42 ± 0.728 g lípidos/100 g biomasa).

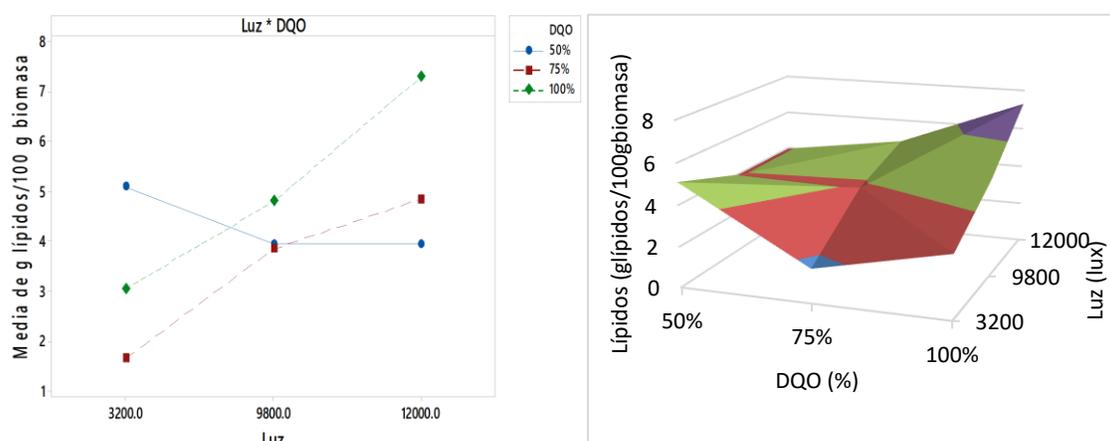


Figura 43 Gráfica de interacción para la producción de lípidos y gráfico de superficie

4.18 Implementación de un fotobiorreactor Applikon para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* con MBB

En esta sección se muestran las cinéticas de crecimiento empleando MBB implementando un fotobiorreactor Applikon con condiciones de iluminación de 12000 lux y 4.8 L/min de flujo de aire.

4.18.1 Evaluación de la densidad celular con MBB

La densidad celular de la microalga *Chlorella vulgaris* en el fotobiorreactor Applikon se incrementó en un 646.78% en un periodo de 16 días, partiendo de una concentración celular inicial de 2.180×10^5 cel/mL hasta 1.41×10^6 cel/mL, como se puede observar en la Figura 44 se inició la fase de crecimiento exponencial con una duración de 14 días y posteriormente, se dio la fase estacionaria a partir del día 15. Estos resultados fueron menores a los reportados

por Robles-Heredia, et al., (2016) quien utilizó un medio enriquecido en un fotobiorreactor *Airlift* anular con la misma iluminación, pero con un flujo de aire de 1.4 vvm (flujo volumétrico de aire por minuto por unidad de volumen de medio) obteniendo 11.82×10^6 cel/mL.

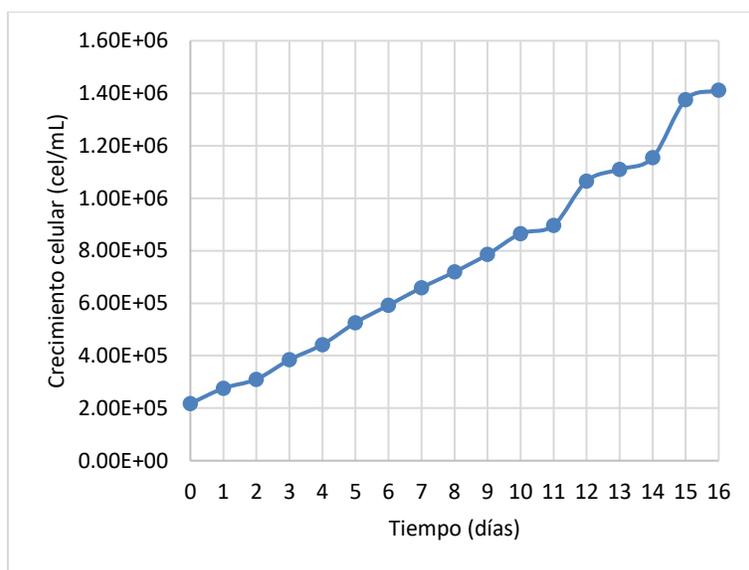


Figura 44 Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactor Applikon con iluminación de 12000 lux y flujo de aire de 4.8 L/min

El modelo matemático de crecimiento microbiano de Gompertz mostrado en la Figura 45a presentó un valor de R^2 de 0.9859 mientras que el logístico obtuvo un ajuste de R^2 de 0.9742.

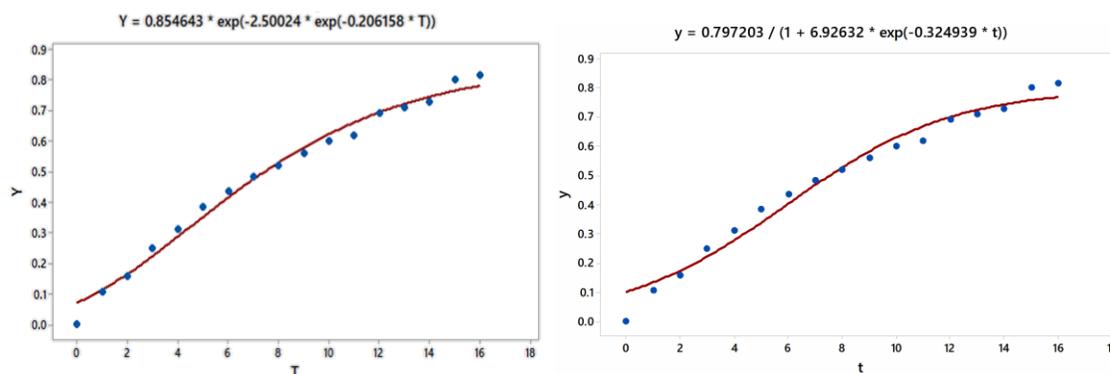


Figura 45 a) Gráfica línea ajustada modelo de Gompertz y b) modelo logístico para crecimiento de microalga *Chlorella vulgaris* con MBB en fotobiorreactor Applikon

4.18.2 Evaluación de la producción de biomasa por peso seco

En el fotobiorreactor Applikon la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* alcanzó 2.8 g/L, este valor es superior a los obtenidos por Lee, et al., (2011) de 1.98 g/L de biomasa de

Chlorella vulgaris en medio sintético con una iluminación de $135.14 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ (10000 lux) con diferentes concentraciones de CO_2 a los 11 días de cultivo (Figura 46).

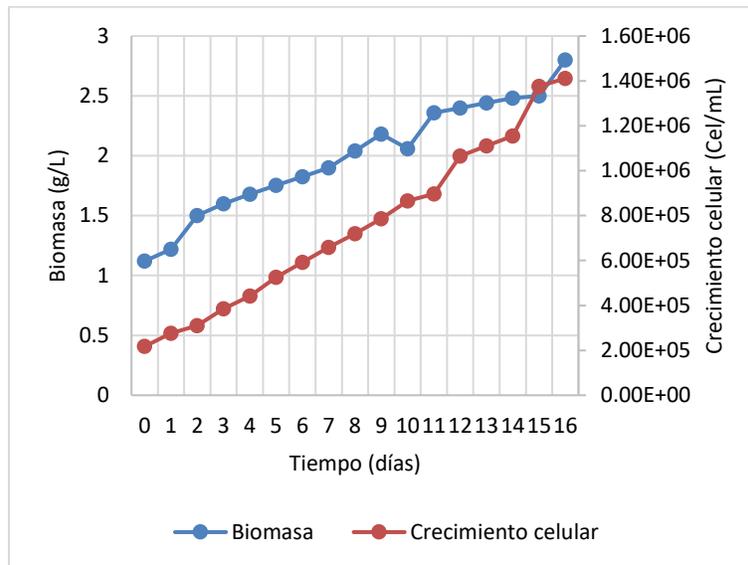


Figura 46 Producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* con MBB en un fotobiorreactor Applikon

Díaz Ovalle y Restrepo Manrique , (2011) indican que el pH es uno de los factores más importantes en el cultivo de microalgas, el cual es afectado por la cantidad de dióxido de carbono disuelto y la temperatura, que a su vez controla la solubilidad del CO_2 y la actividad metabólica de las microalgas. El pH inicial fue de 6.97 incrementándose hasta alcanzar 8.46 (Figura 47) conforme la edad del cultivo debido a que está relacionado con el crecimiento celular. Por otro lado, la temperatura en el fotobiorreactor Applikon, se mantuvo entre 25 y 35 °C, estos valores son adecuados para el crecimiento de la microalga, la temperatura de operación es importante ya que a temperaturas menores de 16 °C el crecimiento disminuye y a temperaturas mayores de 35 °C el crecimiento celular se inhibe y resulta letal para las microalgas.

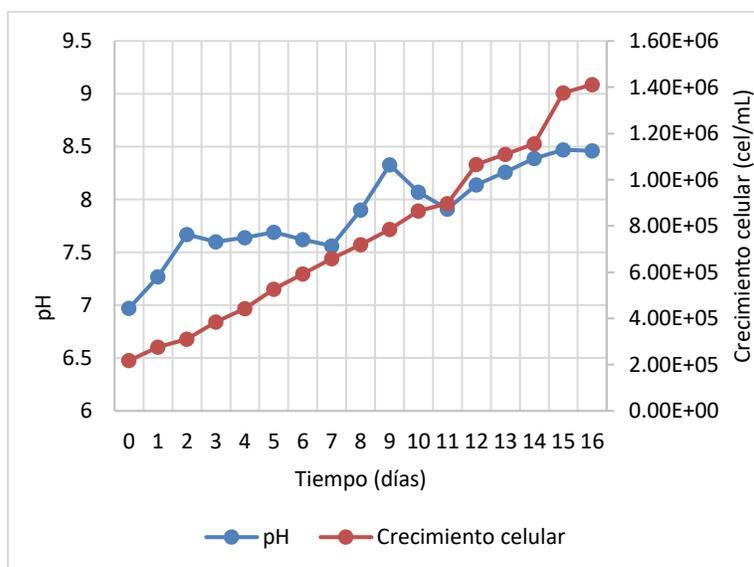


Figura 47 Cinética del comportamiento del pH en el fotobiorreactor Applikon

4.18.3 Producción de proteínas

La producción de proteínas al operar el fotobiorreactor Applikon con un MBB fue de 276.76 mg/L. Los resultados obtenidos son similares a los reportado en la literatura por Chinnasamy, et al., (2009) quien obtuvo 42 $\mu\text{g/mL}$ (42 mg/L) en un cultivo de aguas residuales con la microalga *Chlorella vulgaris* con diferentes concentraciones de CO_2 (6%) y con temperatura de 40 °C.

4.18.4 Producción de carbohidratos

La producción de carbohidratos durante la cinética de crecimiento alcanzó los 387.60 mg/L, estos resultados son superiores a los reportados por Chinnasamy, et al., (2009) de 250 mg/L; al evaluar el incremento de biomasa en un cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* en aguas residuales bajo niveles elevados de CO_2 (6 %) y temperatura (30 °C).

4.18.5 Producción de clorofila *a*, *b* y clorofilas totales

La producción de clorofila *a* de la microalga *Chlorella vulgaris* en el fotobiorreactor Applikon con MBB fue de 3.86125 $\mu\text{g/mL}$ superior a lo reportado por Chol-Jin, et al., (2019) de $2.25 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ en un cultivo de la misma microalga, pero en medio sintético BG-11 y diferentes concentraciones de NaCl (200 mM). Para clorofila *b* se obtuvo un valor de 2.17233 $\mu\text{g/mL}$, valor muy aproximado a los obtenidos por Chol-Jin, et al., (2019) que reportaron un valor de $2.02 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ de clorofila *b* con las mismas condiciones anteriormente descritas, pero con diferente concentración de NaCl (100 mM). El contenido

de clorofilas totales fue de 4.8116 $\mu\text{g/mL}$, la producción de clorofilas totales es similar a lo reportado por Chinnasamy, et al., (2009) de 2.05 $\mu\text{g/mL}$ en un cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* con diferentes concentraciones de CO_2 (0.036 %) y temperaturas elevadas (40 °C).

4.18.6 Producción de lípidos

La producción de lípidos obtenidos por microalga *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactor Applikon con MBB fue de 17.5 g/100 g biomasa. Converti et al., (2009) obtuvo 14.71 ± 0.30 g/100 g biomasa en un cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* a diferentes temperaturas (25 °C). Según lo descrito por Robles Heredia et al., (2016) la producción de lípidos a partir de microalgas no sólo depende de la concentración de biomasa, sino también del contenido de aceite celular, cabe recalcar que, bajo condiciones de estrés por limitación de nutrientes, el crecimiento celular disminuye mientras que la producción de lípidos aumenta.

4.18.7 Evaluación de las propiedades reológicas

En la Figura 48 se muestra el comportamiento del fluido de la microalga en MBB para los días 0, 8 y 16 de la cinética, en la cual se observa un comportamiento no Newtoniano.

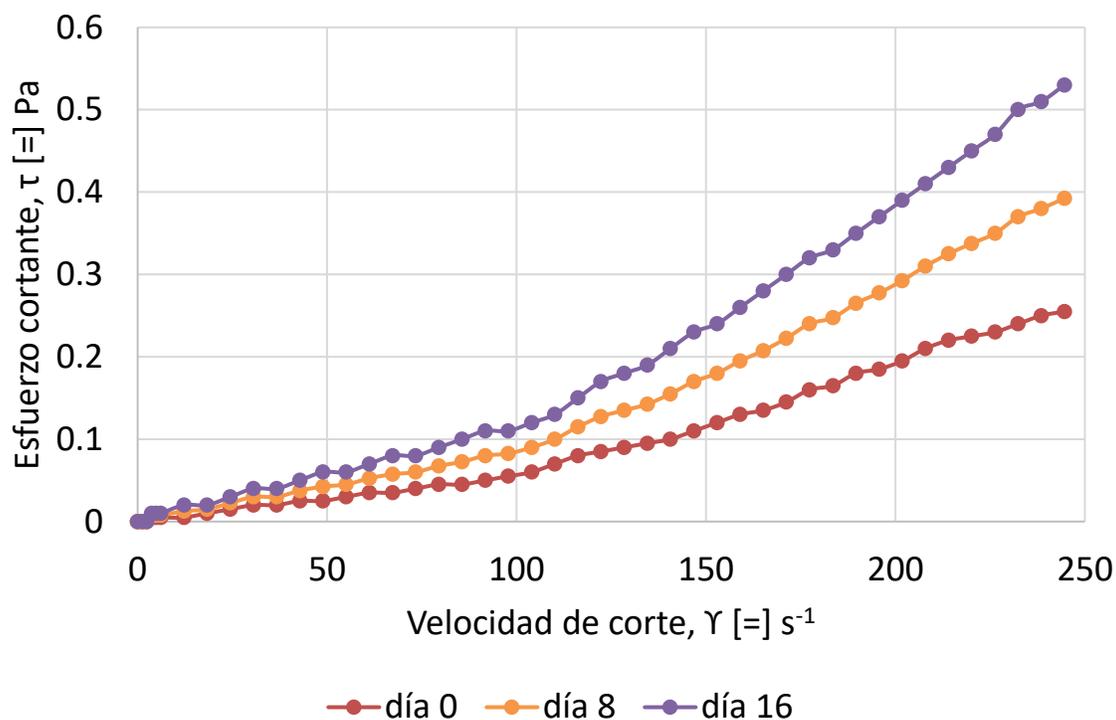


Figura 48 Comportamiento reológico de la microalga *Chlorella vulgaris* en MBB

En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos para los modelos reológicos donde τ representa el esfuerzo cortante, τ_0 es el límite elástico, k es el índice de consistencia, la cual indica la cohesión del fluido, así mismo es una medición indirecta de la viscosidad y n representa el índice de comportamiento de flujo y que indica el grado de desviación del comportamiento del fluido con respecto del de un fluido Newtoniano, se encontró que el fluido tiene un comportamiento dilatante con un valor de $n > 1$, por lo que al incrementar el esfuerzo cortante con respecto a la velocidad de corte la viscosidad aumenta.

Tabla 15 Parámetros de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para MBB con *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min

Tiempo (días)	Modelo	τ_0	K	n
0	Ostwald de Waele		3.750E-05	1.609
0	Ostwald de Waele Linealizado		-2.133E-02	0.001
0	Herschel Bulkley	0.005	2.168E-05	1.706
8	Ostwald de Waele		5.446	1.617
8	Ostwald de Waele Linealizado		-3.171E-02	0.001
8	Herschel Bulkley	0.010	2.836E-05	1.732
16	Ostwald de Waele		7.144E-05	1.620
16	Ostwald de Waele Linealizado		-4.209E-02	0.002
16	Herschel Bulkley	0.0145	3.524E-05	1.746

En la Tabla 16 se muestran los modelos de Ostwald de Waele, el modelo de Ostwald de Waele linealizado y el modelo de Herschel-Bulkley para describir el comportamiento reológico de MBB con microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor Applikon, los modelos con mejor ajuste fueron los modelos de Herschel Bulkley con $R^2 > 0.99$. Los datos obtenidos se ajustaron a los modelos para gradientes de velocidades desde 0 hasta 250 s^{-1} .

Tabla 16 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para MBB con *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min

Tiempo (días)	Modelo	Ecuación	R ²
0	Ostwald de Waele	$\tau = 3.75003x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.60963}$	0.996
0	Ostwald de Waele Linealizado	$\log \tau = -2.13333x10^{-2} + 0.00102751 \log \dot{\gamma}$	0.955
0	Herschel Bulkley	$\tau = 0.0057516 + 2.16821x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.70673}$	0.997
8	Ostwald de Waele	$\tau = 5.446x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.617}$	0.996
8	Ostwald de Waele Linealizado	$\log \tau = -3.171x10^{-2} + 0.001 \log \dot{\gamma}$	0.954
8	Herschel Bulkley	$\tau = 0.010 + 2.836x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.732}$	0.998
16	Ostwald de Waele	$\tau = 7.14454x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.62078}$	0.996
16	Ostwald de Waele Linealizado	$\log \tau = -4.20935x10^{-2} + 0.00206979 \log \dot{\gamma}$	0.955
16	Herschel Bulkley	$\tau = 0.0145206 + 3.52477x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.7462}$	0.998

4.19 Implementación de un fotobiorreactor Applikon para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* con ARIA

Se realizó una cinética de crecimiento en el fotobiorreactor Applikon con microalga *Chlorella vulgaris*, con una intensidad de luz de 12000 lux con un flujo de aire de 4.8 L/min.

4.19.1 Crecimiento celular y DQO en un fotobiorreactor Applikon

En la Figura 49 se muestra el comportamiento del crecimiento celular y la DQO con respecto al tiempo, se empleó ARIA con una DQO inicial de 784.3 mg/L iniciando con una densidad celular de $1.37x10^5$ cel/mL ARIA. Se obtuvo un incremento celular de 510 % en agua residual industrial avícola, estos resultados son comparables con el estudio de Andrade R., et al., (2009) en dicho estudio se utilizó la microalga *Scenedesmus sp* que tuvo un crecimiento celular del 639% pero en agua residual de pescadería. Sandoval Herrera, et al., (2018) utilizó

la microalga *Chlorella vulgaris* adaptada en agua residual urbana tratada por la PTAR salitre donde obtuvo un crecimiento del 236.36%.

La concentración final de DQO lograda fue de 39.21 mg/L, la remoción de DQO fue de 95%, este resultado supera a los obtenidos por Sandoval Herrera, et al., (2018) el cual consiguió remociones del 73.19% y 81.80% trabajando en agua residual urbana de la PTAR salitre como medio de cultivo, empleando *Chlorella vulgaris* previamente adaptada. El resultado obtenido supera las remociones obtenidas por Andrade R., et al., (2009) cuyo porcentaje fue de 71.17 % de remoción, sin embargo, esta degradación se realizó con la microalga *Scenedesmus sp.*

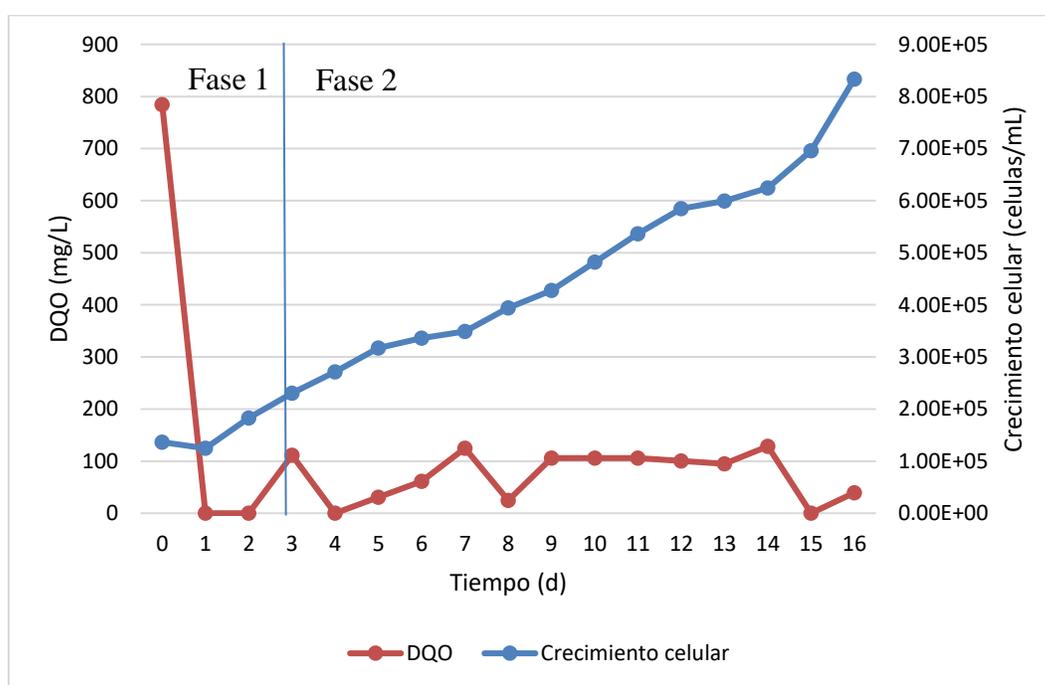


Figura 49 Crecimiento celular y DQO en un fotobiorreactor Applikon en las condiciones de 12000 lux y DQO inicial de 784.3 mg/L

Los modelos matemáticos de crecimiento microbiano se muestran en la Figura 50, el modelo logístico tuvo una $R^2 = 0.9469$, el modelo de Gompertz tuvo un valor de $R^2 = 0.9637$, por lo que el modelo de Gompertz describe de mejor manera el comportamiento de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en ARIA en un reactor Applikon con respecto al tiempo, ambos modelos permiten dar seguimiento y predecir el crecimiento celular.

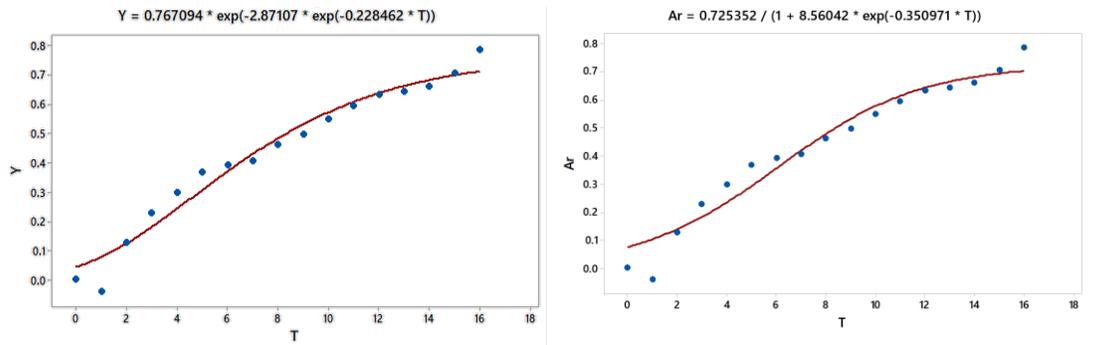


Figura 50 a) Gráfica línea ajustada modelo de Gompertz y b) modelo logístico para crecimiento de microalga *Chlorella vulgaris* con ARIA en un fotobiorreactor Applikon

4.19.2 Comportamiento de nitritos, oxígeno disuelto y pH en un fotobiorreactor Applikon

El comportamiento de los nitritos, oxígeno disuelto y pH, se muestran en la Figura 51, se observa el proceso de nitrificación, las microalgas producen oxígeno disuelto en los primeros 2 días, lo que permitió la oxidación del nitrógeno amoniacal o amoniaco a nitritos, se observó también que al disminuir la cantidad de oxígeno disuelto la producción de nitritos disminuye, a partir del día 5 la cantidad de oxígeno disuelto se incrementa por lo que los nitritos se oxidan a nitratos, esto también está relacionado con el comportamiento de pH.

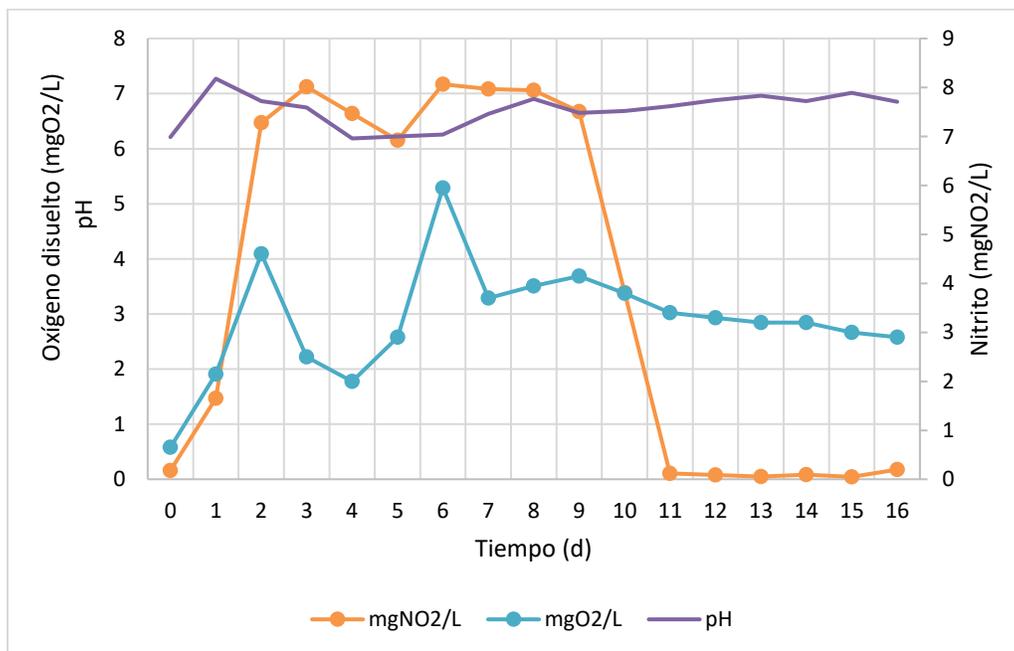


Figura 51 Comportamiento de nitritos, oxígeno disuelto y pH

4.19.3 Evaluación del desempeño de la biomasa por peso seco en un fotobiorreactor Applikon

En la Figura 52 se aprecia el comportamiento de la biomasa por peso seco, el reactor inició con una concentración de 0.81 g/L y alcanzó una concentración de 2.155 g/L, equivalente al 166.05 % de productividad de biomasa en el agua residual industrial avícola, estos resultados son superiores a los obtenidos por Daneshvar, et al., (2018) que utilizó la microalga *Chlorella vulgaris*, sin embargo, empleó agua residual de pulpa + agua de lago en concentración de 40:60 y obtuvo una cantidad final de biomasa de 1.21 g/L, esto indica que el ARIA tiene los nutrientes necesarios para la producción de biomasa.

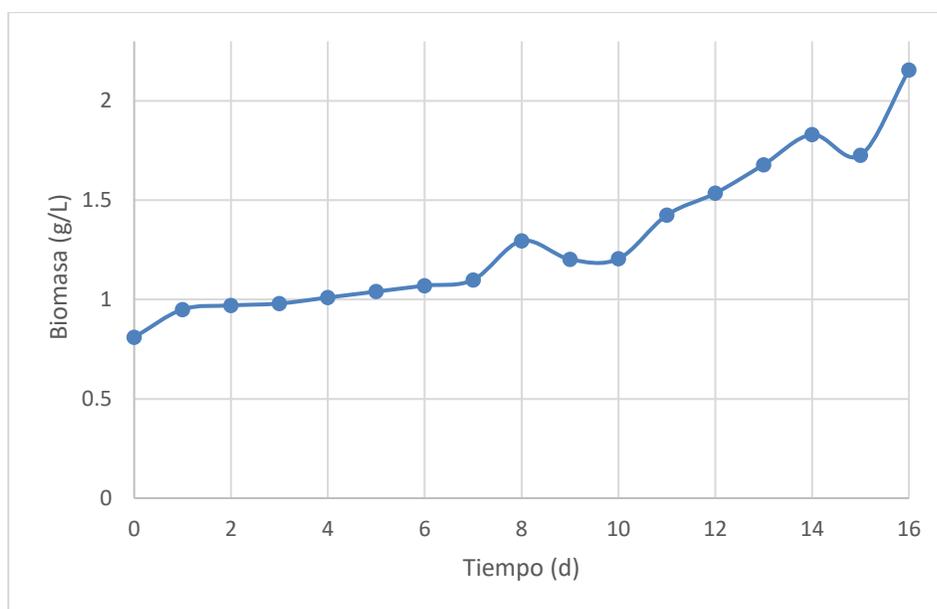


Figura 52 Evaluación de la biomasa por peso seco en un fotobiorreactor Applikon

4.19.4 Evaluación del desempeño en la producción de proteínas en un fotobiorreactor Applikon

En un fotobiorreactor Applikon al inocular la microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual industrial avícola (ARIA) se registró una concentración inicial de proteínas de 63.8235 mg/L, después de 16 días de cultivo la concentración fue de 170.5882 mg/L, logrando un incremento de 106.7647 mg/L, equivalente a 267.2811 % de aumento de las proteínas. Este resultado supera a los obtenidos por Chinnasamy, et al., (2009), donde lograron una producción de 96 $\mu\text{g/mL}$ (96 mg/L) a temperatura de 30°C con diferentes concentraciones de CO₂ en el agua residual y la microalga *Chlorella vulgaris*.

4.19.5 Evaluación del desempeño en la producción de carbohidratos en un fotobiorreactor Applikon

La producción de carbohidratos de *Chlorella vulgaris* en el fotobiorreactor Applikon fue de 211.48%. La concentración inicial (día 0) fue de 35.23 mg/L, 16 días después se encontró un resultado de 74.52 mg/L, por lo que se generaron 39.28 mg/L. Al compararlo con lo obtenido por Chinnasamy, et al., (2009) el cual cultivó la microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual en las condiciones de 30 °C y 6% de CO₂, obtuvo la cantidad de 250 µg/L (250 mg/L).

4.19.6 Evaluación del desempeño de lípidos en un fotobiorreactor Applikon

El resultado arrojado en la producción de lípidos fue de 3.2 g lípidos/100 g biomasa, estos resultados son menores en comparación de los obtenidos por Herrera Yañez (2017) que lograron obtener 16.10 g lípidos/100 g biomasa trabajando con el Medio de cultivo Bold Basal (MBB) empleando la *Chlorella vulgaris*.

4.19.7 Evaluación del desempeño de pigmentos en un fotobiorreactor Applikon

Se evaluó la producción de clorofila *a* y clorofila *b* en µg/mL en un fotobiorreactor Applikon, obteniendo una concentración de 0.1759 µg/mL de clorofila *a*, en el caso de la clorofila *b* no se obtuvo una producción al finalizar la cinética de crecimiento, de acuerdo con lo reportado por Yun Ming, et al., (2013) que al cultivar la microalga *Chlorella sorokiniana* C3 en un medio BG11 (sintético) reportó mayor producción de clorofila *a* de 5.402 ± 0.539 µg/mL con limitación de nitrógeno y de 8.324 ± 0.773 µg/mL con libertad de nitrógeno, para clorofila *b* produjo 1.496 ± 0.247 µg/mL y 2.894 ± 0.029 µg/mL en las condiciones mencionadas.

4.19.8 Comportamiento de la densidad relativa

En la Figura 53 se muestra el comportamiento de la densidad relativa, teniendo un valor de 0.9995 en día inicial (inoculo), la cual durante el periodo del cultivo se mantuvo oscilando entre 0.998 y 1.001, el incremento en la densidad relativa se debe al incremento en la concentración de biomasa por lo que se sugiere a partir del día 12 realizar una cosecha de esta.

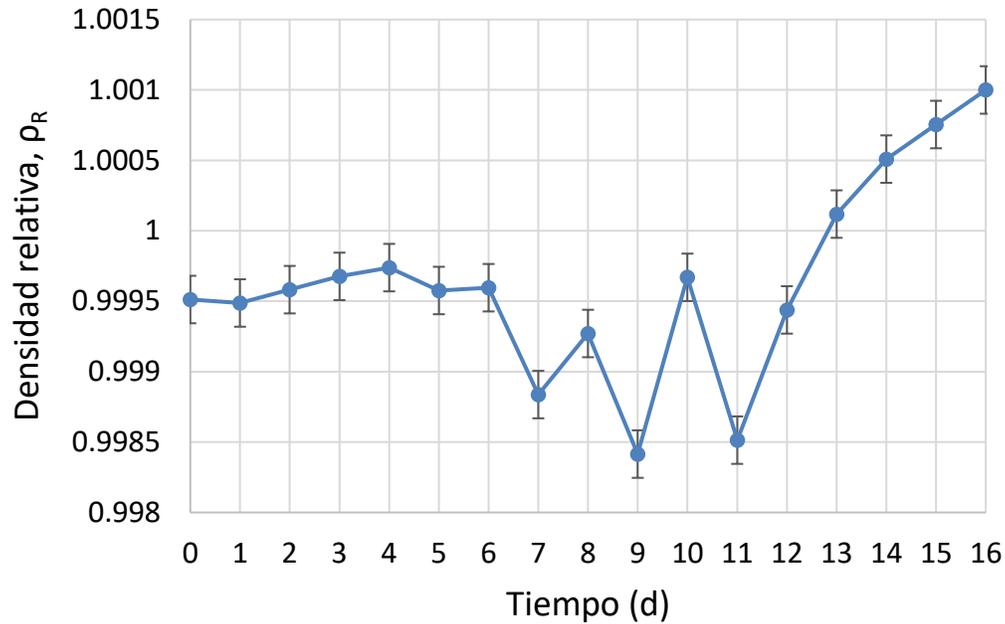


Figura 53 Comportamiento de la densidad relativa en un fotobiorreactor Applikon

4.19.9 Comportamiento de la temperatura en fotobiorreactor Applikon

En la Figura 54 se muestra el comportamiento de la temperatura a lo largo del proceso del tratamiento de agua residual industrial avícola por la microalga *Chlorella vulgaris*, donde se puede notar que las temperaturas se encuentran dentro del rango normativo para las aguas residuales y, además, dentro de los rangos establecidos para que la microalga se pueda reproducir adecuadamente.

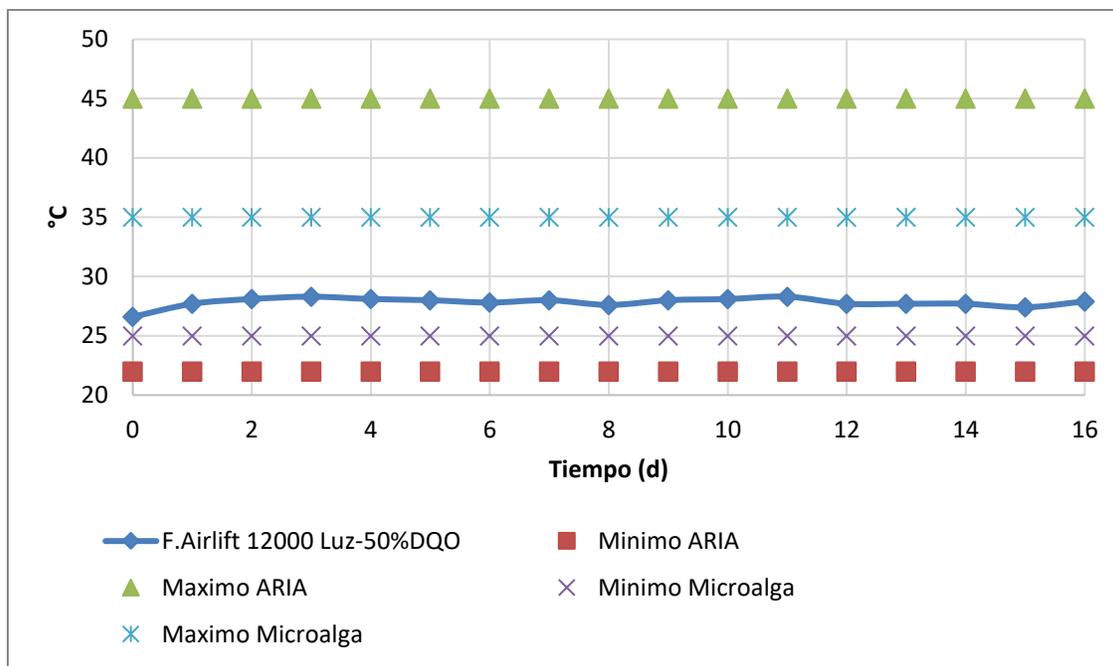


Figura 54 Comportamiento de la temperatura

4.19.10 Evaluación de la turbidez en fotobiorreactor Applikon

En la Figura 55 se muestra que del día 1 con una concentración de 74.9 NTU al día 16 con una concentración de 3.4 NTU, se puede observar una considerable disminución de turbidez equivalente a 95.4606% teniendo en cuenta que desde el día 1 la turbidez se redujo en casi su totalidad, los resultados de turbidez que se obtuvieron se encuentran dentro del rango permisible por la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-012-SCFI-2001 de <4. Al comparar el resultado obtenido con Sandoval Herrera, et al., (2018) el cual utilizó la microalga *Chlorella vulgaris* en agua residual de la PTAR salitre, obtuvo una remoción del 92.17%, siendo mayor la obtenida con ARIA.

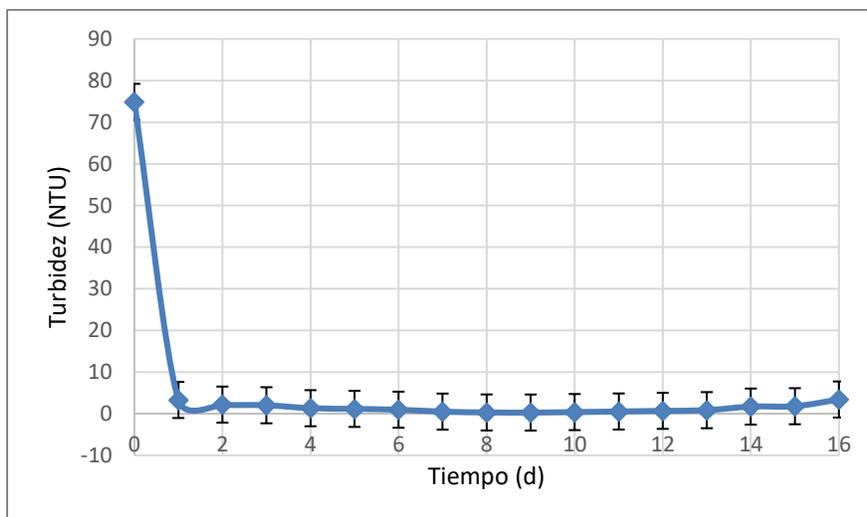


Figura 55 Evaluación de turbidez en un fotobiorreactor Applikon

4.19.11 Evaluación de Sólidos totales, suspendidos y volátiles

En la Figura 56 se muestra el comportamiento de los sólidos en el agua residual industrial avícola realizado en un fotobiorreactor Applikon, con una concentración inicial de ST, STV y SS de 840 mg/L, 620 mg/L y 320 mg/L respectivamente y concentración final de 440 mg/L, 160 mg/L y 20 mg/L, lo cual corresponde a una reducción de los sólidos en 47.61%, 74.19% y 93.75%. Los resultados obtenidos se pueden comparar con Sandoval Herrera, et al., (2018) que obtuvo remoción de ST de 49% y de STV de 75.85% al utilizar la microalga *Chlorella vulgaris* con una adaptación previa al cultivo en agua residual de la PTAR salitre.

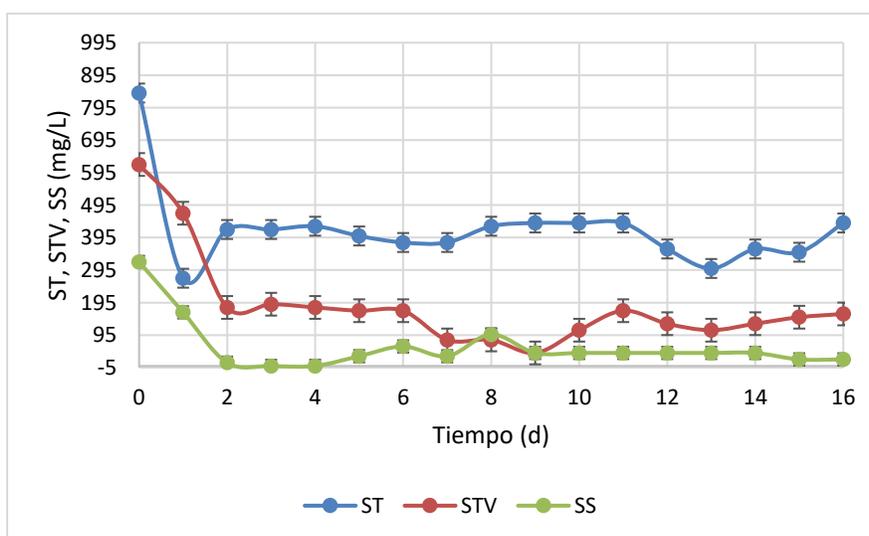


Figura 56 Evaluación de sólidos totales, sólidos suspendidos y sólidos totales volátiles

4.19.12 Propiedades reológicas

En la Figura 57 se muestra el comportamiento reológico del fluido de la microalga en ARIA, el cual mostró un comportamiento no Newtoniano con características de un fluido dilatante ($n > 1$), ya que en los fluidos dilatantes el ritmo del incremento del esfuerzo cortante con la velocidad de corte se incrementa. Se observa que entre el día inicial (0) y el día final (16) el comportamiento reológico del fluido es casi idéntico al no sufrir afectaciones en su composición.

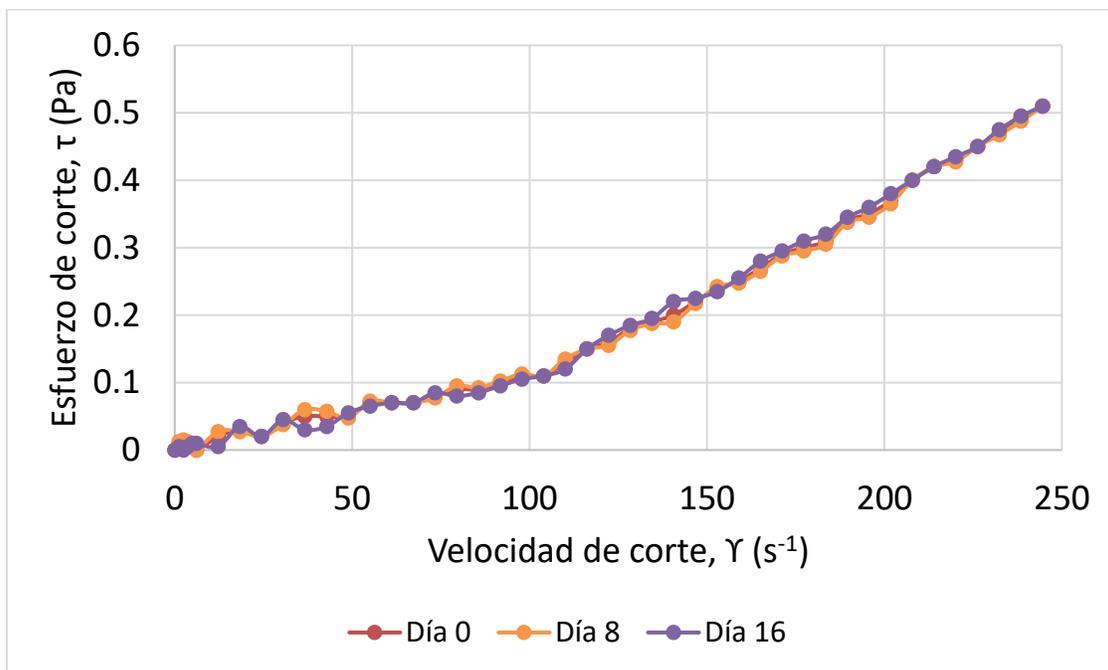


Figura 57 Comportamiento reológico de la microalga en ARIA

El comportamiento dentro del reactor fue laminar de acuerdo con el número de Reynolds, este comportamiento se presentó durante los 16 días de cultivo tanto para modelo clásico como para el modificado. El tamaño medio de la burbuja fue de 0.003 m con un promedio de velocidad de 0.24 m/s, los números de Reynolds se muestran en la Figura 58, como se mencionó se mantuvo un régimen laminar a lo largo del cultivo esto coincidió con las trayectorias ascendentes de las burbujas

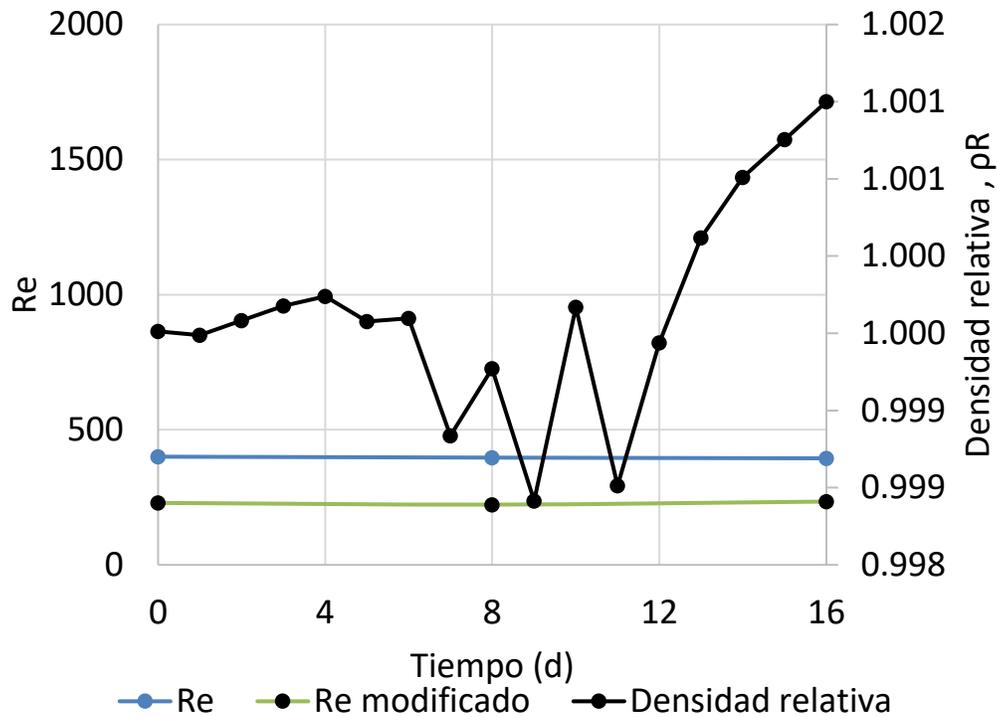


Figura 58 Número de Reynolds, densidad relativa durante la cinética de crecimiento en ARIA

La Tabla 17 y la Tabla 18 muestran los parámetros y los modelos que describen el comportamiento reológico con *Chlorella vulgaris* en agua residual de la industria avícola en un fotobiorreactor Applikon, los datos obtenidos se ajustaron para gradientes de velocidad de 0 a 250 s^{-1} . Los modelos que mejor se adaptan a ambos cultivos (MBB y ARIA) fueron los obtenidos por Herschel Bulkley con $R^2 > 0.997$. Los valores de $n > 1$ indicaron que, al aumentar la fuerza cortante con respecto a la velocidad de corte, la viscosidad aumenta. Esto es debido a que en este tipo de fluidos se tiene una estructura interna que se expande al aumentar la velocidad de deformación.

Tabla 17 Parámetros de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para ARIA con *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min

Tiempo (días)	Modelo	τ_0	K	n
0	Ostwald de Waele		7.573E-05	1.601
0	Ostwald de Waele Linealizado		-3.806E-02	0.001
0	Herschel Bulkley	0.016	3.364E-05	1.745
8	Ostwald de Waele		7.647E-05	1.599
8	Ostwald de Waele Linealizado		-3.567E-02	0.001
8	Herschel Bulkley	0.019	2.803E-05	1.77
16	Ostwald de Waele		7.452E-05	1.607
16	Ostwald de Waele Linealizado		-0.042	0.002
16	Herschel Bulkley	0.010	4.486E-05	1.697

Tabla 18 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Ostwald de Waele linealizado y Herschel Bulkley para ARIA con *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor Applikon con 12000 lux de iluminación y flujo de aire de 4.8 L/min

Tiempo (días)	Modelo	Ecuación	n	R ²
0	Ostwald de Waele	$\tau = 7.573x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.601}$	1.601	0.995
0	Ostwald de Waele Linealizado	$\log \tau = -3.806x10^{-2} + 0.001 \log \dot{\gamma}$	0.001	0.952
0	Herschel Bulkley	$\tau = 0.016 + 3.364x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.745}$	1.745	0.997
8	Ostwald de Waele	$\tau = 7.647x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.599}$	1.599	0.993
8	Ostwald de Waele Linealizado	$\log \tau = -3.567x10^{-2} + 0.001 \log \dot{\gamma}$	0.001	0.949
8	Herschel Bulkley	$\tau = 0.019 + 2.803x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.777}$	1.777	0.996
16	Ostwald de Waele	$\tau = 7.452x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.607}$	1.607	0.996
16	Ostwald de Waele Linealizado	$\log \tau = -0.042 + 0.002 \log \dot{\gamma}$	0.002	0.955
16	Herschel Bulkley	$\tau = 0.010 + 4.486x10^{-5}\dot{\gamma}^{1.697}$	1.697	0.996

4.20 Caracterización de los lípidos extraídos de microalga *Chlorella vulgaris*

Las características fisicoquímicas evaluadas de los lípidos obtenidos por extracción con solventes de la microalga *Chlorella vulgaris* fueron índice de saponificación, índice de acidez, densidad, humedad y material volátil, así como el índice de refracción. Debido a que no existe una normatividad específica para aceites de microalgas, los resultados obtenidos, se compararon con los límites máximos permisibles de aceite vegetal establecidos en las normas mexicanas aceite de cártamo (NMX-F-161-SCFI-2007), aceite de canola (NMX-F-475-SCFI-2017) y aceite de girasol (NMX-F-265-SCFI-2005).

4.20.1 Evaluación del índice de saponificación en los lípidos extraídos

Los lípidos extraídos a partir de la microalga presentaron un índice de saponificación de 187.98 mg KOH/g. El valor obtenido en este estudio es bajo comparado con la investigación Xia, et al., (2020) quien obtuvo un valor de 192.57 ± 2.54 mg KOH/g la diferencia en la extracción fue que usaron microalga humedad y hexano/ácido formico. En la Tabla 19 se puede observar que el valor obtenido se encuentra dentro del rango establecido para diversos aceites vegetales, estos valores de referencia indican que el aceite obtenido de la microalga *Chlorella vulgaris* puede emplearse en la reacción de transesterificación con una menor producción de jabón que los lípidos obtenidos por Xia, et al., (2020).

Tabla 19 Valores de índice de saponificación en Normas Mexicanas

Parámetro	Norma aplicada	Resultado	NMX-F-161-SCFI-2007	NMX-F-265-SCFI-2005	NMX-F-475-SCFI-2017
Índice de saponificación (mg KOH/g)	NMX-F174-SCFI-2014	187.98	186-198	188-194	182-193

4.20.2 Evaluación del índice de acidez en los lípidos extraídos.

Los lípidos extraídos a partir de la microalga presentaron un índice de acidez de 0.449%, dicho valor supera el límite máximo permisible de las normas mexicanas de aceites y grasas vegetales, es importante aclarar que la normatividad no es específica para lípidos de microalgas y es por ello por lo que queda fuera del límite tal como se muestra en Tabla 20. Sin embargo, este valor es bajo comparado con la investigación de Khalaji, et al., (2021) que

presentó valores de $5.67 \pm 0.42\%$ en la microalga *Chlorella vulgaris*. El valor encontrado es muy cercano al valor obtenido por Tejeda-Benítez, et al., (2015). El valor encontrado en este estudio es menor al compararse con el índice de acidez de otras semillas como la semilla de *Azadirachta indica* (neem) el cual es de 1.69 % (Martínez, et al., 2016).

Tabla 20 Valores de índice de acidez en Normas Mexicanas

Parámetro	Norma aplicada	Resultado	NMX-F-161-SCFI-2007	NMX-F-265-SCFI-2005	NMX-F-475-SCFI-2017
Índice de acidez (%)	NMX-F-101-SCFI-2012	0.44	0.05	0.05	0.05

4.20.3 Evaluación de la densidad relativa en los lípidos extraídos

El valor de la densidad relativa (Tabla 21) de los lípidos obtenidos de la microalga *Chlorella vulgaris* fue de 0.8973, este resultado se encuentra dentro de los límites permisibles establecidos por las normas mexicanas. Este valor coincide con el encontrado en la literatura para *Chlorella vulgaris* de 0.8984 para un aceite extraído con un método similar (Karthikeyan, et al., 2020). Karthikeyan, et al., (2020) mencionan que esto puede ser ideal para la reacción de transesterificación.

Tabla 21 Valores de densidad relativa en Normas Mexicanas

Parámetro	Norma aplicada	Resultado	NMX-F-161-SCFI-2007	NMX-F-265-SCFI-2005	NMX-F-475-SCFI-2017
Densidad relativa (Adimensional)	NMX-F-075-SCFI-2012	0.8973	0.919-0.924	0.919-0.924	0.919-0.924

4.20.4 Evaluación de humedad en los lípidos extraídos de *Chlorella vulgaris*.

Los lípidos extraídos de la microalga presentaron un valor de humedad de 0.047% (Tabla 22) el cual se encuentra dentro de los límites permisibles de la norma mexicana de aceites vegetales. El porcentaje de humedad es menor al de los lípidos usando microalgas de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* de 0.1965% (Hu, et al., 2021). El porcentaje de humedad para los aceites que se utilicen para la producción de biodiesel debe de ser bajo, dado que la presencia de humedad disminuye el rendimiento de la reacción, por lo que el

aceite obtenido puede ser utilizado en el proceso de transesterificación para la obtención de biodiesel.

Tabla 22 Valores de humedad en Normas Mexicanas

Parámetro	Norma aplicada	Resultado	NMX-F-161-SCFI-2007	NMX-F-265-SCFI-2005	NMX-F-475-SCFI-2017
Humedad (%)	NMX-F-211-SCFI-2006	0.047	0.05	0.05	0.05

4.20.5 Evaluación del índice de refracción en los lípidos extraídos.

Los lípidos extraídos presentaron un índice de refracción de 1.4630, el valor obtenido cumple con el límite permisible de las normas mexicanas que se muestran en la Tabla 23. Cho, et al., (2015) encontró un índice de refracción de 1.4650 para la microalga *Chlorella vulgaris* pero cultivada en el efluente de un sistema de fermentación de residuos orgánicos, el cual fue ideal para la reacción de transesterificación, este índice es un indicador de la pureza del aceite, por lo tanto, se puede decir que el aceite extraído por el método de solventes cumple con el nivel de pureza para la obtención de biodiesel.

Tabla 23 Valores de índice de refracción en Normas Mexicanas

Parámetro	Norma aplicada	Resultado	NMX-F-161-SCFI-2007	NMX-F-265-SCFI-2005	NMX-F-475-SCFI-2017
Índice de refracción (Adimensional)	NMX-F-074-SCFI-2011	1.4630	1.467-1.470	1.467 1.469	1.465-1.467

4.21 Evaluación de la calidad y rendimiento del biodiesel obtenido por transesterificación enzimática con lípidos de microalga *Chlorella vulgaris*.

En la Figura 59 se puede observar que los mayores rendimientos (82.26 ± 0.21 %) se obtuvieron con una temperatura de reacción de 35°C y una relación molar aceite: alcohol de 1:9. Al aumentar la cantidad de alcohol (metanol) empleando una relación molar mayor el rendimiento aumentó, esto se debió a que un exceso de alcohol aumenta el ataque al enlace produciéndose con mayor facilidad el intercambio del grupo funcional. Al disminuir la temperatura el rendimiento aumentó, esto se debe a que a mayores temperaturas las enzimas

se desactivan, esto coincide con Guo, et al., (2020) quienes alcanzaron conversiones de hasta 94.6% con una temperatura de reacción de 30°C y con una relación molar de 1:7, sin embargo, en dicho estudio utilizaron lipasa A de *Candida antártica*. Por lo que se puede deducir que al disminuir la temperatura y aumentar la relación molar la conversión a biodiesel aumentó.

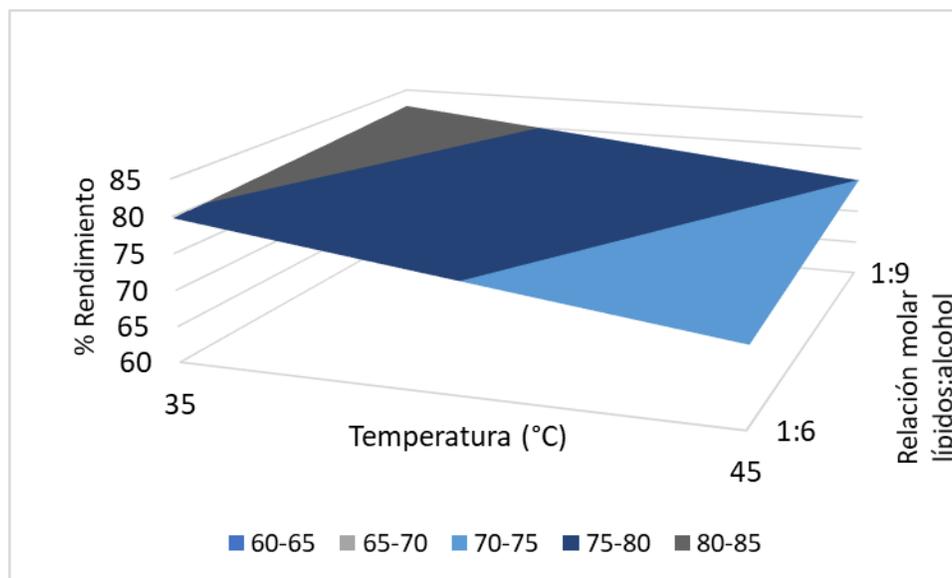


Figura 59 Rendimiento de la conversión de lípidos a biodiesel a diferentes temperaturas y relaciones molares

Empleando las mejores condiciones de temperatura (35°C) se realizó la evaluación del rendimiento con diferentes concentraciones de enzima y relaciones molares. En la Figura 60 se observa que los rendimientos más altos (83.3 ± 0.535 %) se obtuvieron con 1 % de enzima y relación molar de 1:6. Los rendimientos más bajos se obtuvieron con 0.5 % de enzima y relación molar de 1:9 (62.4 ± 0.57 %).

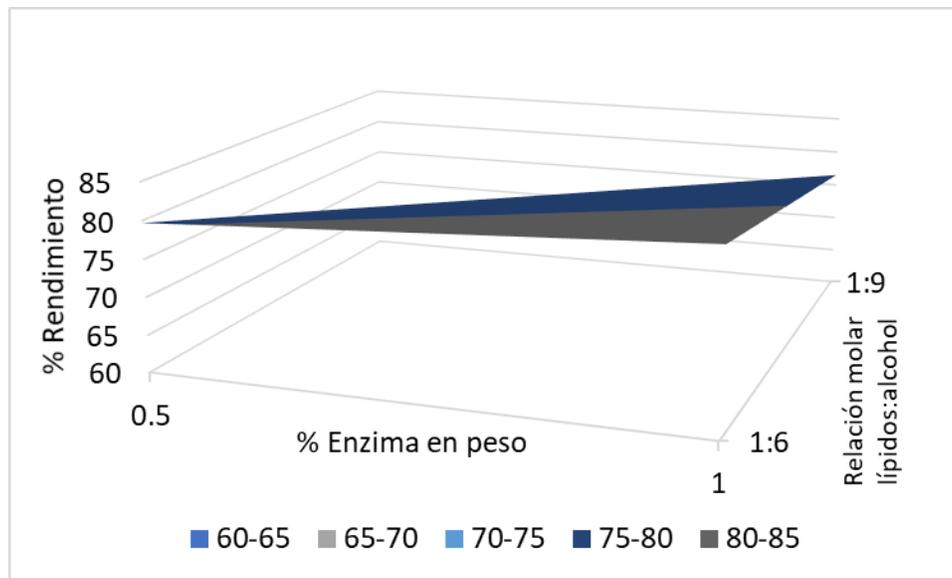


Figura 60 Rendimiento de la conversión de lípidos a diferentes % de enzima y relaciones molares

4.21.1 Evaluación de la viscosidad del biodiesel obtenido por ruta biológica

Los valores de viscosidad cinemática más altos ($4.28 \pm 0.021 \text{ mm}^2/\text{s}$) se obtuvieron con una temperatura de reacción de 45°C y 1:6 de relación molar. Mientras que con 35°C de temperatura y 1:9 de relación molar se obtuvo la viscosidad más baja de $1.94 \pm 0.01 \text{ mm}^2/\text{s}$. La norma internacional ASTM D445 establece que los límites permisibles para la viscosidad cinemática son de 1.9 a $6 \text{ mm}^2/\text{s}$, todos los valores obtenidos en este estudio se encontraron dentro de la norma, los cuales son ideales y no tienen efectos en la atomización del biocombustible en la cámara de combustión, ni provoca problemas operativos como depósitos en el motor (Knothe, 2012) estos problemas se presentarían al tener viscosidades superiores a los indicados en la norma. En el diagrama de Pareto de efectos estandarizados que se muestra en la Figura 61a, se puede observar que los factores y la interacción (temperatura $p=0.00001$, relación molar $p=0.00001$ y la interacción $p=0.01$) muestran un efecto significativo. Sin embargo, el factor con mayor influencia sobre la viscosidad fue la temperatura en la reacción de transesterificación, ya que las enzimas se desnaturalizan con la temperatura. La relación molar también es significativa porque la cantidad de alcohol presente en la reacción influye en el intercambio del grupo funcional y para que la reacción se lleve a cabo el alcohol debe estar en exceso, sin embargo, cantidades altas de alcohol podrían disminuir el rendimiento como se observa en la gráfica de superficie Figura 61b.

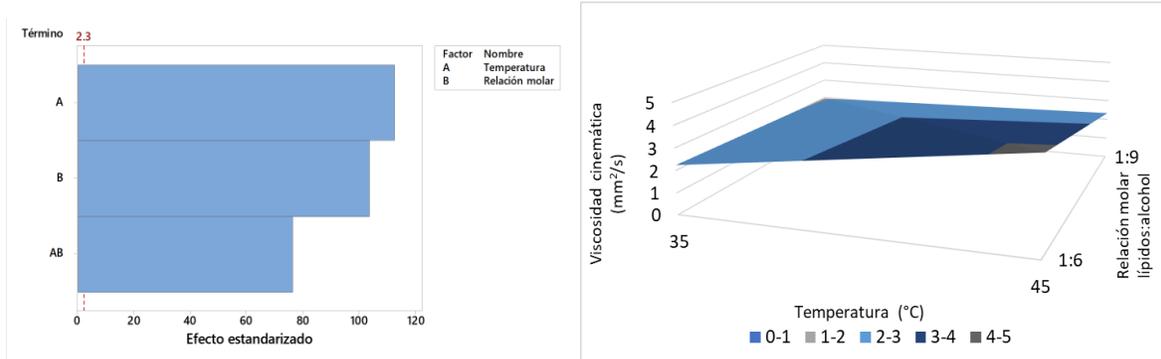


Figura 61 a) Diagrama de Pareto de efectos estandarizados b) Gráfica de superficie para viscosidad del biodiesel con respecto a la temperatura de reacción y la relación molar lípidos:alcohol

Con los resultados obtenidos en este diseño experimental se estableció una temperatura de reacción de 35°C para la obtención de biodiesel. Posterior a esto se obtuvieron los resultados de la evaluación de concentración de enzima en % en peso y la relación molar de lípidos:alcohol (metanol). La viscosidad cinemática promedio ($4.83 \pm 0.3 \text{ mm}^2/\text{s}$) obtenida en este estudio con una relación molar de 1:9 tanto para 0.5 % como para 1% en peso de enzima cumplieron con la norma ASTM D455. En la Tabla 24 se muestran los resultados con una relación molar de 1:6 y 1 % de enzima.

Tabla 24 Viscosidad cinemática a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM	EN	NTP
Viscosidad cinemática	mm ² /s	2.618±0.004	1.9-6	3.5-5	1.9-6

La viscosidad de biodiesel obtenido se ve afectada con la relación molar utilizada en el proceso de transesterificación, esto se puede observar en el diagrama de Pareto de la Figura 62a. En el diagrama de efectos principales de la Figura 62b se muestra que para obtener menores valores de viscosidad cinemática se debe utilizar un 0.5 % en peso de enzima con una relación molar de 1:6. El biodiesel obtenido cumple con este parámetro de calidad el cual es importante para el desempeño de un motor y es por ello que en los diversos motores viene especificado el valor máximo permitido de viscosidad.

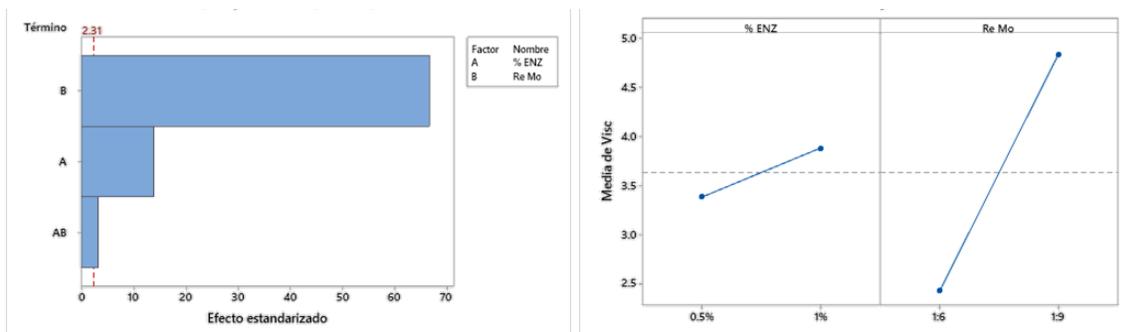


Figura 62 a) Diagrama de Pareto b) Diagrama de efectos principales para viscosidad cinemática con diferentes concentraciones de enzima y relaciones molares

4.21.2 Evaluación del número de ácido del biodiesel obtenido por ruta biológica

El biodiesel obtenido a partir de lípidos de microalga *Chlorella vulgaris* tuvieron valores de 0.43 ± 0.011 mg de KOH/g a 35°C y relación molar de 1:9 el cual se encuentra dentro del rango establecido en la norma internacional ASTM D664 (0.50 mg de KOH/g) estos valores son similares a la investigación de Ganesan, et al., (2020) donde obtuvieron un número de ácido de 0.50 mg de KOH/g en la producción de biodiesel a partir de microalgas. Los valores más altos se registraron a una temperatura de 45°C y una relación molar 1:6 siendo este valor de 0.64 ± 0.020 mg de KOH/g el cual supera ligeramente el valor establecido por la norma, los valores superiores a los establecidos en la norma pueden provocar problemas operativos, como la formación de depósitos en el inyector de combustible y corrosión en el tanque de almacenamiento.

El análisis de varianza con índice de confiabilidad del 95% indicó que tanto la temperatura como la relación molar tienen efectos significativos sobre el número de ácido, sin embargo, la interacción entre estos factores no es significativa tal y como se muestra en el diagrama de Pareto (Figura 63 a)). La gráfica de optimización (Figura 63b), muestra la mejor opción de temperatura y relación molar, donde la temperatura a 35°C y la relación molar a 1:9 logra un número de ácido mínimo de 0.43 mg de KOH/g con un porcentaje de exactitud del 94.44% que significa una mejor calidad en el biodiesel.

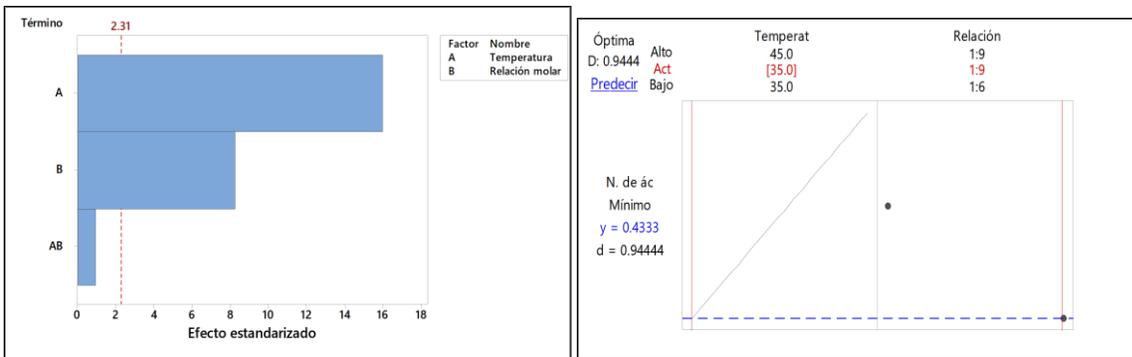


Figura 63 a) Diagrama de Pareto b) Grafica de optimización de respuesta de la mejor temperatura y relación molar para un número de ácido bajo

Con los resultados del diseño experimental anterior se estableció que la temperatura de reacción de 35°C, con la cual se realizó la evaluación de la concentración de enzima en peso y de la relación molar. Los resultados promedio fueron de 0.26 ± 0.08 mg KOH/g los cuales se encontraron dentro de la norma internacional ASTM D664 para el número de ácido que establece un valor máximo de 0.50 mg KOH/g. El análisis del Diagrama de Pareto mostrado en la Figura 64 indica que los factores % de enzima ($p=0.0001$) y relación molar ($p=0.001$) tienen un efecto significativo sobre el número de ácido, los mejores resultados se obtuvieron con un 1% de enzima y una relación molar de 1:6 (Tabla 25), los valores del número de ácido encontrados en este trabajo indican que el biodiesel cumple con el parámetro de calidad de número de ácido disminuyendo la probabilidad de corrosión del tanque de combustible.

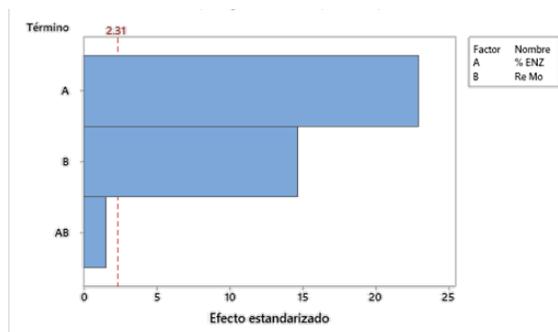


Figura 64 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el número de ácido con valores de % en peso de enzima y relaciones molares lípidos:alcohol

Tabla 25 Número de ácido a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM	EN
Número de ácido o índice de acidez	mg KOH/g	0.123	Máximo 0.50	Máximo 0.50

4.21.3 Evaluación de la densidad del biodiesel obtenido por ruta biológica

La densidad del biodiesel obtenido a partir de los lípidos de microalga *Chlorella vulgaris*, al evaluar la temperatura de reacción de transesterificación de 35°C y una relación molar de 1:9 aceite-metanol presentó valores de 0.8157 ± 0.0079 g/mL los cuales, cumple la norma internacional ASTM D1298 que establece como límites permisibles 0.86-0.90 g/mL. Los valores más altos se obtuvieron a una temperatura de 45°C y relación molar de 1:6 aceite-metanol (0.8807 ± 0.0045 g/mL) como se muestra en la Figura 65a, esto es importante dado que una densidad elevada influye en la eficiencia de la atomización del combustible por mala ventilación del sistema de combustión, la densidad tiene muchos efectos sobre la desintegración del combustible inyectado dentro del cilindro (García-Muentes, et al., 2018). En la Figura 65b se muestra el diagrama de Pareto y de efectos estandarizados, la temperatura ($p=0.00001$) y la relación molar (0.007) son factores estadísticamente significativos en la densidad del biodiesel, mientras la interacción de dichos factores no tuvo un efecto significativo ($p=0.163$).

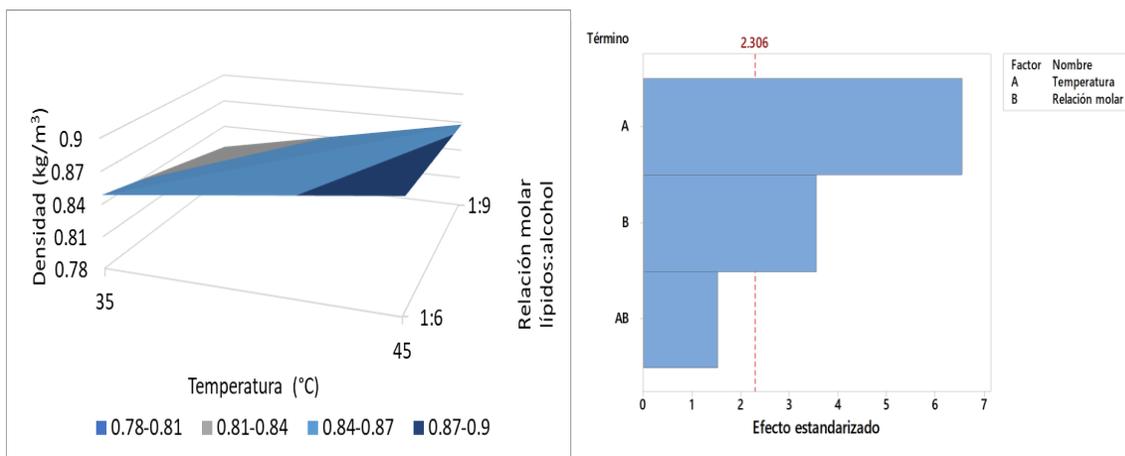


Figura 65 a) Gráfica de superficie b) Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de la temperatura y la relación molar lípidos:alcohol en la densidad del biodiesel

Con la temperatura de reacción de 35°C se realizó la evaluación de la concentración de enzima (0.5% y 1%) y la relación molar (1:6 y 1:9), los valores obtenidos fueron de 0.8636 ± 0.005 g/mL. El diagrama de Pareto (Figura 66a) indicó que la interacción entre el % de enzima utilizado en la reacción y la relación molar lípido:alcohol es el factor que más influye en la densidad del biodiesel obtenido ($p=0.00001$), otro factor que afecta a la densidad es la relación molar ($p=0.001$). La cantidad de catalizador empleada en la reacción (% de enzima en peso) no tiene un efecto significativo en la densidad del biodiesel, dado que el catalizador se recupera y no sale en el producto final (biodiesel). En la gráfica de efectos principales de la Figura 66b muestra que para ambas concentraciones de catalizador los resultados presentan valores cercanos a la media, mientras que en la relación molar lípido:alcohol 1:6 se obtiene un biodiesel con menor densidad.

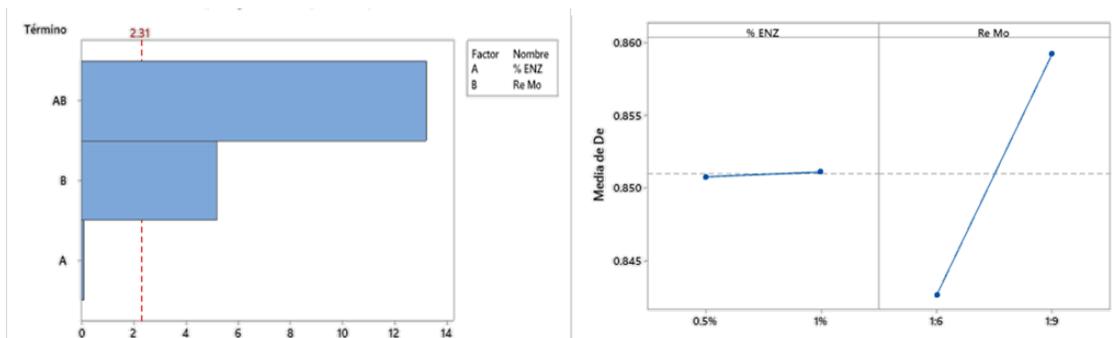


Figura 66 a) Diagrama de Pareto, b) Diagrama de efectos principales para densidad con diferentes % de enzima en peso y diferentes relaciones molares

Los valores de la densidad obtenidos en este estudio a 35°C con una relación molar 1:6 y 1% de enzima presentó valores muy cercanos a los indicados en las diferentes normas internacionales (Tabla 26).

Tabla 26 Densidad a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM	EN	NTP
Densidad	g/mL	0.821 ± 0.004	0.86-0.90	086-0.9	0.86-0.9

4.21.4 Evaluación del punto de nube del biodiesel obtenido por ruta biológica

La evaluación de la temperatura de reacción y la relación molar de lípidos:alcohol sobre el punto de nube se indican en la Figura 67 en la que se puede observar el diagrama de Pareto

y el análisis de varianza (con IC del 95%) indicaron que la temperatura y la relación molar tienen un efecto significativo sobre el punto de nube, el factor con mayor influencia es la temperatura ($p=0.00001$), la relación molar también tiene un efecto sobre el punto de nube ($p=0.029$). Sin embargo, la interacción entre estos factores no tiene un efecto significativo. En la Figura 67b se observa que a una temperatura de reacción de 35°C y una relación molar de 1:9 se obtienen menores puntos de nube, todos los valores de este estudio se encontraron dentro de los límites (-3°C a -12°C) establecidos en la norma internacional ASTM D2500-17, el valor promedio encontrado fue de $-6^{\circ}\text{C} \pm 0.6$.

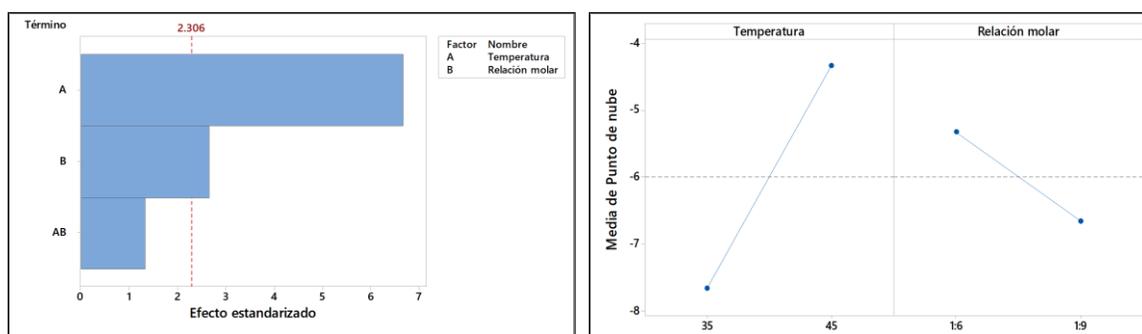


Figura 67 a) Diagrama de Pareto, b) Gráfica de efectos principales para el punto de nube con diferentes temperaturas de reacción y relaciones molares lípidos:alcohol

Los resultados de punto de nube al evaluar los factores concentración de enzima (% en peso) y la relación molar lípidos:alcohol a una temperatura de reacción de 35°C (temperatura seleccionada de acuerdo con los resultados del diseño experimental en el que se evaluó temperatura de reacción) se muestran en la Figura 68a y Figura 68b.

La Figura 68a (diagrama de Pareto) y el ANOVA (IC=95%) indicaron que el % de enzima presente en la reacción de transesterificación tuvo un efecto significativo en el punto de nube ($p=0.0001$). Mientras que la relación molar y la interacción % de enzima y relación molar no tuvieron un efecto significativo en el punto de nube de biodiesel. La gráfica de efectos principales Figura 68b indicó que al incrementar la concentración de enzima a 1% en peso el punto de nube se incrementa. Los resultados para el punto de nube de fueron $-7 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, este valor también se encontró dentro de los límites establecidos en la norma ASTM D2500-17 (Tabla 27), valores por fuera de la norma causan daños al motor en lugares muy fríos, esto se debe a que puede formar sólidos en el biocombustible y evita que este pueda verterse libremente. Los valores de punto de nube obtenidos son similares a los de Picó, et al., (2018)

de -4°C a -9°C para biodiesel a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* por esterificación usando catalizadores agregados enzimáticos reticulados magnéticos de lipasa B de *Candida antarctica*.

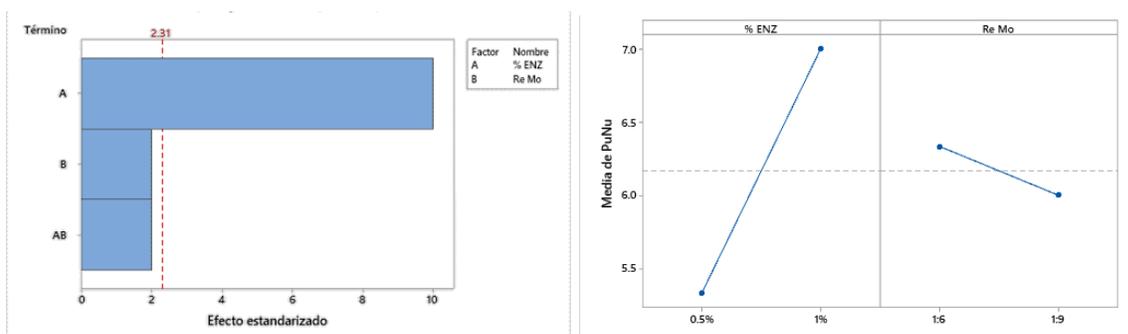


Figura 68 a) Diagrama de Pareto, b) Gráfica de efectos principales para el punto de nube con diferentes % de enzima y relación molar lípidos:alcohol

Tabla 27 Punto de nube a $T=35^{\circ}\text{C}$, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM
Punto de nube	$^{\circ}\text{C}$	-7	-3 a -12

4.21.5 Evaluación del índice de refracción del biodiesel obtenido por ruta biológica

La norma internacional ASTM D1218-12 establece un índice de refracción de 1.46 a 1.5 (Tabla 28), el análisis de varianza indicó que la temperatura y la relación molar tienen un efecto significativo en la producción de biodiesel con valores de $p=0.00001$ y $p=0.001$ respectivamente, como se puede observar en la Figura 69 a la temperatura más alta, el índice de refracción no cumplió con el valor establecido en la norma, esto indica un biodiesel de baja calidad, ya que el índice de refracción es un indicador que permite estudiar el grado de saturación de ésteres predominantes, al tener un índice de refracción alto indica que un haz de luz que viaja a través de medios se traslada lentamente, por lo tanto, revelan la presencia de impurezas las cuales intervienen en el resultado (Mohd Khazaai, et al., 2021). En la Figura 69 se puede observar que a temperaturas de reacción de 35°C con relaciones molares de 1:9

el índice de refracción (1.447 ± 0.002) se encuentra dentro de la norma por lo que esto indica que el biodiesel cumple con los parámetros de calidad.

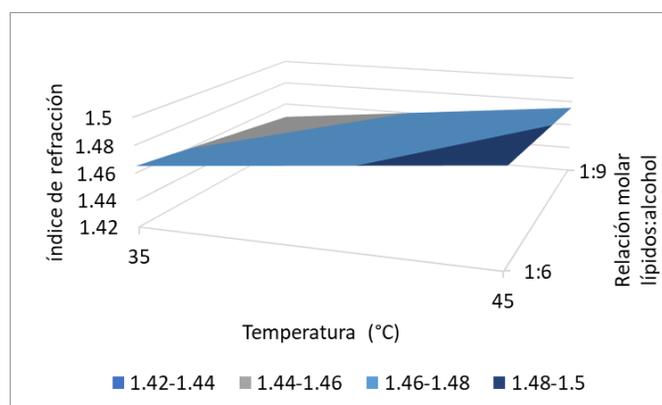


Figura 69 Gráfica de superficie para el índice de refracción a diferentes temperaturas de reacción y diferentes relaciones molares de lípidos:alcohol

Con la temperatura de 35°C se realizó la evaluación de la concentración de enzima y de relaciones molares, los resultados promedio fueron de 1.447 ± 0.004 , por lo que no es necesario implementar una purificación de este. El índice de refracción obtenido con 1% en peso de enzima y relación molar 1:6 se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28 Índice de refracción a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM
Índice de refracción	Adimensional	1.442	1.46 a 1.5

En la Figura 70 se observa que la relación molar es un factor altamente significativo ($p=0.00001$) sobre el índice de refracción. La interacción del factor % de enzima y relación molar lípidos:alcohol ($p=0.0001$) también tiene un efecto significativo sobre el índice de refracción del biodiesel.

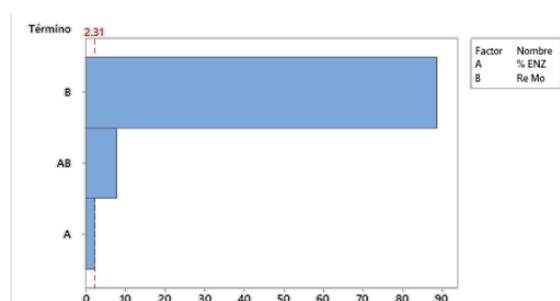


Figura 70 Diagrama de Pareto para índice de refracción con los factores % de enzima y relación molar

4.21.6 Evaluación de la corrosividad al cobre del biodiesel obtenido por ruta biológica

Para todos los experimentos se encontraron resultados negativos de corrosividad tanto en la evaluación de la temperatura como en la evaluación del % de enzima en peso a diferentes relaciones molares, por lo que el biodiesel obtenido por transesterificación enzimática con lípidos de microalgas cumple con la norma internacional ASTM D130-19 la cual establece un estandar con un valor mínimo (1a) y uno máximo (4c). El biodiesel se compone de ácidos grasos saturados e insaturados, con el tiempo es susceptible a la oxidación, por lo que forma gomas insolubles, depósitos y otros productos secundarios de oxidación, como aldehídos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular y cetonas que intensifican la acidez y la corrosividad (Oni, et al., 2022).

4.21.7 Evaluación al punto de inflamación del biodiesel obtenido por ruta biológica

El valor mínimo de punto de inflamación establecido en la norma internacional ASTM D4530-15 es de 130°C. Al evaluar la temperatura de reacción y la relación molar de lípidos:alcohol se encontró mediante el análisis de varianza y el diagrama de Pareto que la temperatura de reacción ($p=0.0001$) y la relación molar ($p=0.003$), son factores que afectaron significativamente el punto de inflamación del biodiesel obtenido.

En la gráfica de superficie Figura 71 b) se observa que los valores más bajos de punto de inflamación se obtuvieron a temperaturas de reacción de 35°C y relación molar de 1:9; el valor obtenido bajo estas condiciones fue de 147°C \pm 0.816, el cual cumple con la norma ASTM D4530-15 al superar el límite mínimo establecido, los resultados obtenidos son semejantes a los obtenidos por Wu, et al., (2017) para la misma microalga por catálisis enzimática a 40°C de temperatura de reacción obtuvieron valores de 148°C a 163°C, esta propiedad es fundamental para la manipulación segura de productos combustibles, especialmente en lugares de alta temperatura. A medida que se incrementa la temperatura, aumenta la presión de vapor y también la cantidad de líquido inflamable evaporado (Santos, et al., 2020).

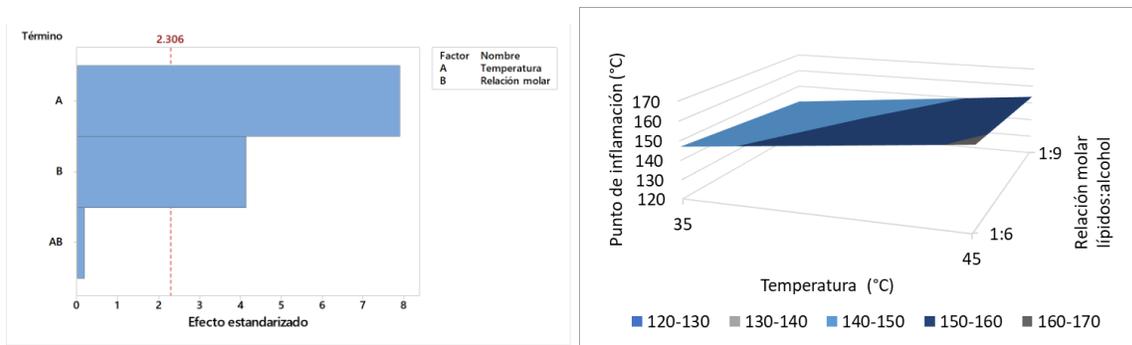


Figura 71 a) Diagrama de Pareto b) Gráfica de superficie para punto de inflamación a diferentes temperaturas y relaciones molares lípidos:alcohol

A pesar de que a la temperatura de 35 °C el punto de inflamación es más bajo que a 45°C cumple con la normatividad por lo que se seleccionó esta temperatura para realizar la evaluación de la concentración ya que esta temperatura cumplió con un mayor número de parámetros. Al evaluar concentración de enzima (0.5 % y 1 %) y relación molar (1:6 y 1:9) todos los valores se encontraron dentro de la norma con un valor promedio de $235 \pm 9.6^{\circ}\text{C}$, Los resultados con 1% de enzima y relación molar de 1:6 se muestran en la Tabla 29, estos resultados indican que el biodiesel obtenido mediante esta ruta biológica es seguro durante el almacenamiento.

El diagrama de Pareto que se muestra en la Figura 72 y el análisis de varianza indicaron que el factor % de enzima ($p=0.0001$) y relación molar ($p=0.012$) tienen un efecto significativo sobre el punto de inflamación del biodiesel, mientras que la interacción de estos factores no influyó al obtener valores de $p>0.05$ ($p=0.075$)

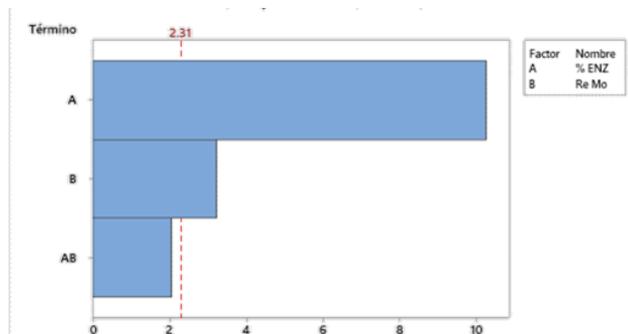


Figura 72 Diagrama de Pareto para el punto de inflamación con los factores porcentaje en peso de enzima y relaciones molares

Tabla 29 Punto de inflamación a T=35 °C, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM	EN	NTP
Punto de inflamación	°C	235 ±9.6°C	Mín. 130	Mín. 120	Mín. 130

4.21.8 Evaluación del residuo de carbono del biodiesel obtenido por ruta biológica

El análisis de varianza indicó que la temperatura de reacción ($p=0.00001$) y la relación molar lípidos:alcohol ($p=0.00001$) tienen un efecto significativo en el porcentaje de residuos de carbono con valores de $p<0.05$. El valor promedio de residuos de carbono (0.038 ± 0.001 % en peso) obtenido a diferentes temperaturas y relaciones molares no superó el límite máximo establecido por la norma internacional ASTM D4530-15 de 0.05% en peso. En la Figura 73 se puede observar que para tener valores bajos de residuos de carbono se requiere temperaturas de reacción de 35°C y relación molar de 1:9. Los valores más bajos de residuos de carbono (0.025 ± 0.001) se obtuvieron a 35°C y relación molar de lípidos:alcohol de 1:9.

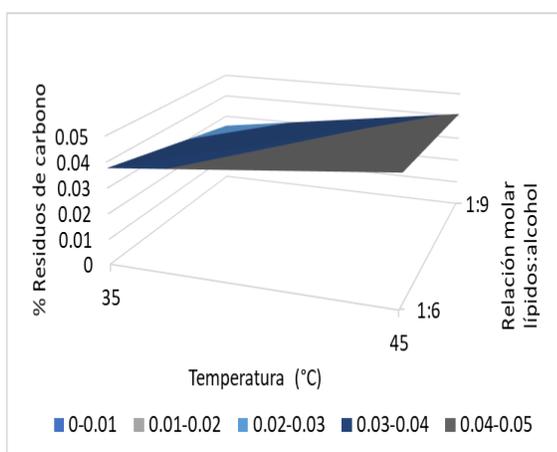


Figura 73 Gráfica de superficie para el % de residuos de carbono a diferentes temperaturas y relaciones molares de lípidos:alcohol

Los resultados de la evaluación de la concentración de enzima en porcentaje en peso y la relación molar de lípidos:alcohol se obtuvieron una vez establecidas las condiciones de temperatura de reacción (35°C). El biodiesel encontrado para las diferentes concentraciones de enzima y relaciones molares lípido:alcohol cumplieron con la norma con un valor promedio de 0.031 ± 0.006 . Los resultados para 1% de enzima y relación molar de 1:6 se muestran en la Tabla 30, valores por debajo de 0.05 son deseables dado que indican una baja

tendencia del combustible a formar coque en los motores, evitando de esta manera problemas operativos (Sbihi, et al., 2014), los valores obtenidos disminuyen la probabilidades de degradación de biodiesel en condiciones de almacenamiento a altas temperaturas. Los datos obtenidos en esta investigación son similares a los de Choong, et al., (2016) cuyos valores de residuo de carbono fueron de 0.05% en peso de una reacción de transesterificación de la microalga *Chlamydomonas.sp.* utilizando como catalizador lipasas inmovilizadas.

El diagrama de Pareto (Figura 74a) y el análisis de varianza indicó que el porcentaje de enzima, la relación molar de lípidos:alcohol y la interacción entre estos factores son significativos con valores de $p < 0.05$ ($p = 0.00001$, $p = 0.00001$ y $p = 0.043$ respectivamente), para obtener menor porcentaje de residuos de carbono debe emplearse 1 % de enzima en peso y una relación molar de 1:6 esto se observa en el diagrama de efectos principales de la Figura 74b.

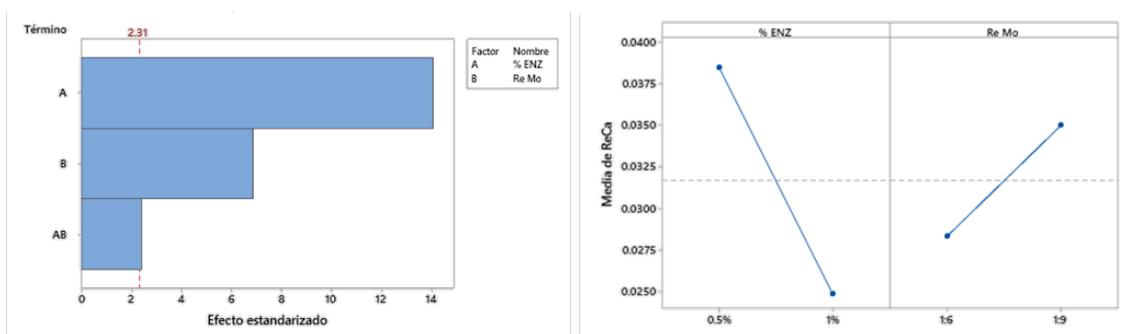


Figura 74 a) Diagrama de Pareto b) Diagrama de efectos principales para residuos de carbono con los factores concentración de enzima y relación molar lípidos:alcohol

Tabla 30 Residuos de carbono a $T = 35^{\circ}\text{C}$, Relación molar 1:6 y 1 % en peso de enzima

Parámetro	Unidad de medida	Resultado	ASTM
Residuos de carbono	% en peso	0.02 ± 0.001	0.05%

4.21.9 Reología del biodiesel obtenido por ruta biológica

En la Figura 75 se muestra el reograma al evaluar las temperaturas de reacción de 35°C y 45°C con diferentes relaciones molares, se observa que la relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de corte tiene una relación lineal que parte del origen, esta característica es propia de los fluidos Newtonianos.

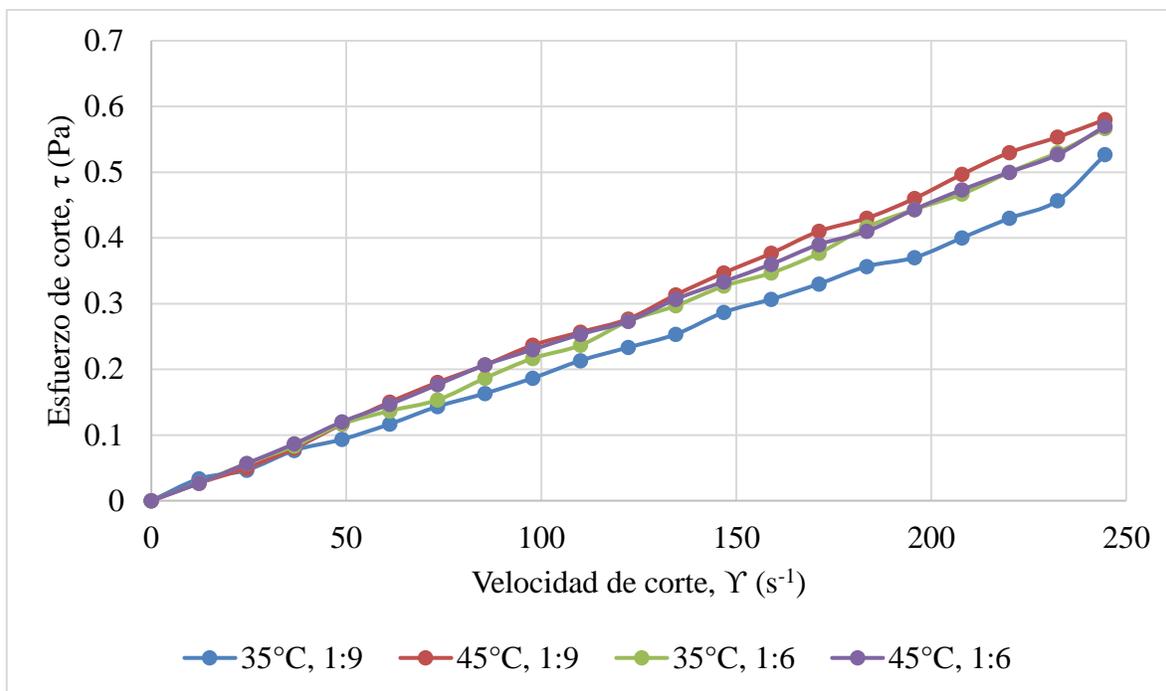


Figura 75 Reograma de la viscosidad experimental de la reacción de transesterificación a diferentes temperaturas y relaciones molares

En la Tabla 31 se muestra la comparativa de las R^2 de los 3 modelos reológicos utilizados en esta investigación, dichos modelos son los de Herschel-Bulkley, Ostwald de Waele o ley de potencia y el Newtoniano, en la tabla se puede observar que los modelos tuvieron un mejor ajuste para relaciones molares de 1:6 con valores de R^2 mayor a 0.99, el modelo de Herschel-Bulkley y el modelo de Ostwald son los que tuvieron un mayor ajuste. Los valores de n son aproximadamente igual a 1 por lo que se considera que el biodiesel tiene un comportamiento Newtoniano.

Tabla 31 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Herscher Bulkley y Newton para biodiesel obtenido de transesterificación enzimática con lípidos de *Chlorella vulgaris* a 35°C y diferentes relaciones molares lípidos:alcohol

Relación molar	Modelo	Ecuación	n	R ²
1:9	Ostwald de Waele	$\tau = 0.001\dot{\gamma}^{1.052}$	1.052	0.993
1:9	Herschel Bulkley	$\tau = 0.022 + 0.001\dot{\gamma}^{1.172}$	1.172	0.995
1:9	Newton	$\tau = -0.001\dot{\gamma}$		0.992
1:6	Ostwald de Waele	$\tau = 0.002\dot{\gamma}^{1.040}$	1.040	0.998
1:6	Herschel Bulkley	$\tau = 0.013 + 0.001\dot{\gamma}^{1.097}$	1.097	0.998
1:6	Newton	$\tau = -0.003\dot{\gamma}$		0.997

Los mejores resultados se obtuvieron a 35°C, una vez establecida la temperatura de reacción se realizó el segundo diseño de experimentos que permitió evaluar las propiedades reológicas del biodiesel empleando diferentes porcentajes de enzima en peso y diferentes relaciones del lípidos:alcohol. La relación entre los gradientes de velocidad y los esfuerzos cortantes se muestra en la Figura 76 en donde se observa un comportamiento reológico Newtoniano, este mismo comportamiento se presentó en la evaluación de la temperatura.

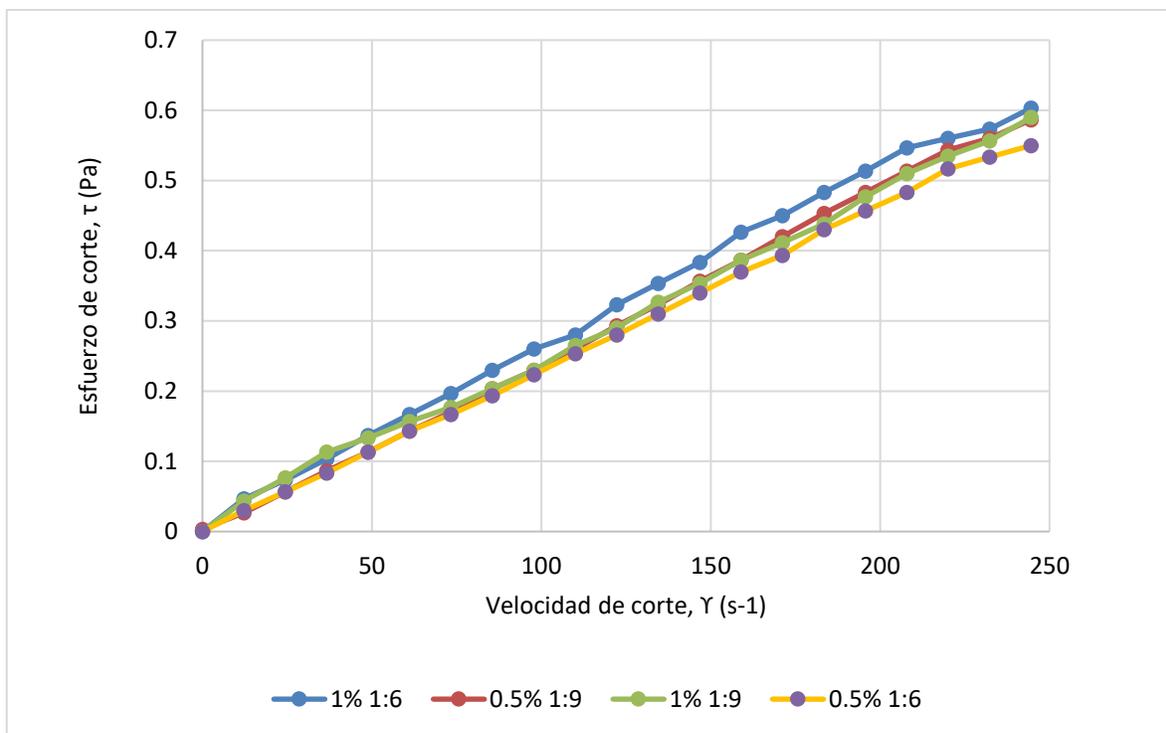


Figura 76 Reograma de la viscosidad experimental de la reacción de transesterificación a diferentes % en peso de enzima y relaciones molares lípidos:alcohol

En la Tabla 32 se muestran los modelos reológicos en los que se puede observar que a una relación molar de 1:6 con 0.5 % de enzima presentaron ajustes de $R^2= 0.999$ y con 1% de enzima $R^2=0.998$, los ajustes disminuyeron para la relación molar de 1:9, sin embargo, a pesar de disminuir el valor de R^2 fue superior a 0.99, también en la tabla se observa que los valores de n son muy próximos a 1 por lo que el biodiesel obtenido por transesterificación enzimática con lípidos de microalga tiene un comportamiento Newtoniano cuando se utiliza una temperatura de reacción de 35°C con diferentes porcentajes de enzima y diferentes relaciones molares.

Tabla 32 Ecuaciones y ajuste de los modelos reológicos de Ostwald de Waele o ley de potencia, Herscher Bulkley y Newton para biodiesel obtenido de transesterificación enzimática con lípidos de *Chlorella vulgaris* a 35°C con diferentes % de enzima y relaciones molares lípidos:alcohol

Relación molar	% Enzima	Modelo	Ecuación	n	R ²
1:6	0.5	Ostwald de Waele	$\tau = 0.002\dot{\gamma}^{1.012}$	1.012	0.999
1:6	0.5	Herschel Bulkley	$\tau = 0.011 + 0.001\dot{\gamma}^{1.059}$	1.059	0.999
1:6	0.5	Newton	$\tau = 0.0003\gamma$		0.999
1:6	1	Ostwald de Waele	$\tau = 0.002\dot{\gamma}^{1.021}$	1.020	0.998
1:6	1	Herschel Bulkley	$\tau = 0.016 + 0.001\dot{\gamma}^{1.053}$	1.053	0.998
1:6	1	Newton	$\tau = -0.001\gamma$		0.998
1:9	0.5	Ostwald de Waele	$\tau = 0.015\dot{\gamma}^{0.991}$	0.991	0.995
1:9	0.5	Herschel Bulkley	$\tau = 0.076 + 0.002\dot{\gamma}^{1.022}$	1.022	0.996
1:9	0.5	Newton	$\tau = 0.010\gamma$		0.995
1:9	1	Ostwald de Waele	$\tau = 0.003\dot{\gamma}^{0.942}$	0.942	0.993
1:9	1	Herschel Bulkley	$\tau = -0.010 + 0.005\dot{\gamma}^{0.879}$	0.879	0.993
1:9	1	Newton	$\tau = 0.009\gamma$		0.992

CONCLUSIONES

Se demostró que la intensidad de la luz tiene un efecto significativo sobre la densidad celular y la producción de proteínas, pigmentos y lípidos. Al aumentar la intensidad de la luz, la producción de todos estos parámetros aumentó ya que las microalgas son organismos fotosintéticos. El flujo de aire afectó la producción de pigmentos, y el desarrollo de pigmentos está relacionado con la fuente de carbono que los alimenta. El ARIA requiere tratamiento para cumplir con las normas mexicanas en términos de aguas residuales. El tratamiento con la microalga *Chlorella vulgaris* en presencia de bacterias aerobias fue una herramienta eficiente para la reducción de concentraciones de materia orgánica y nitrógeno, entre otros. La combinación de bacterias y *Chlorella vulgaris* en las aguas residuales de la planta de procesamiento de aves favoreció la eliminación donde los microorganismos presentes realizaron el proceso de degradación de materia orgánica y nitrógeno, generando CO₂, que fue utilizado por las microalgas como fuente de alimento, liberando oxígeno disuelto.

Además, el oxígeno liberado por *Chlorella vulgaris* favoreció la conversión de nitrógeno amoniacal a nitritos, y luego a nitratos, lo que lleva a la nitrificación. Después de este tratamiento en el final de la fase exponencial (Día 12) y al principio de la fase estacionaria (Días 13 y 14), los parámetros que cumplía con las regulaciones mexicanas incluían pH, temperatura, oxígeno disuelto y DQO, y los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la microalga *Chlorella vulgaris* se encontraron presentes. La interacción de la intensidad de la luz y DQO tuvo un efecto significativo en la densidad celular y en los pigmentos. Se demostró que la intensidad de la luz tiene un efecto significativo sobre la densidad celular y la producción de proteínas, pigmentos y lípidos. Se concluyó que, al aumentar la intensidad de la luz, la producción de todos estos parámetros se incrementa. El flujo de aire afectó la producción de pigmentos, y el desarrollo de pigmentos estaba relacionado a la fuente de carbono que los alimentaba; la producción de pigmentos en ARIA fue menor. El ARIA requiere tratamiento para cumplir con las normas mexicanas en términos de aguas residuales. El tratamiento con la microalga *Chlorella vulgaris* fue una herramienta eficiente para la reducción de concentraciones de materia orgánica y nitrógeno, entre otros. La combinación de bacterias y *Chlorella vulgaris* en las aguas residuales de la planta de procesamiento de aves favoreció la eliminación donde los microorganismos presentes

realizaron el proceso de degradación de materia orgánica y nitrógeno, generando CO₂, que es utilizado por las microalgas como fuente de alimento, liberando oxígeno disuelto. Además, el oxígeno liberado por *Chlorella vulgaris* favoreció la conversión de nitrógeno amoniacal a nitritos, y luego a nitratos, lo que lleva a la nitrificación. Después de este tratamiento en el final de la fase exponencial (Día 12) y al principio de la fase estacionaria (Días 13 y 14), los parámetros que cumplieron con las regulaciones mexicanas fueron pH, temperatura, oxígeno disuelto y DQO. El ARIA contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la microalga *Chlorella vulgaris*. La interacción de la intensidad de la luz y DQO tuvo un efecto significativo en la densidad celular y en los pigmentos.

La extracción de lípidos con solventes con un pretratamiento por ultrasonificación fue la que dio mejores rendimientos, los lípidos cumplieron con las normas establecidas para aceites por lo que fueron viables para la transesterificación enzimática.

La temperatura de reacción para la obtención de biodiesel empleando lípidos de *Chlorella vulgaris* utilizando catálisis enzimática con la lipasa *cándida antártica B* que presentó mejores resultados tanto en rendimiento como en calidad del biodiesel fue a 35°C. La temperatura de reacción afecta la viscosidad, el número de ácido, densidad, el punto de nube, el índice de refracción, punto de inflamación, esto se debe a que al aumentar la temperatura la enzima se desnaturaliza, esto provoca que vaya perdiendo su actividad catalítica y esto afecta los parámetros de calidad del biodiesel obtenido. El biodiesel obtenido a partir de esta ruta biológica exhibió un comportamiento reológico Newtoniano.

El porcentaje en peso de enzima lipasa *cándida antártica B* empleada como biocatalizador tuvo un efecto significativo en la viscosidad cinemática, en el número de ácido o índice de acidez, punto de nube, punto de inflamación y residuos de carbono. El porcentaje en peso de enzima y la relación molar de lípidos de microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en ARIA que mejores rendimientos tuvieron en la obtención de biodiesel por la ruta biológica fue 1% y una relación 1:6. Las propiedades reológicas del biodiesel demostraron un comportamiento Newtoniano.

La hipótesis planteada se acepta ya que es posible la producción de biodiesel a partir de la obtención de parámetros cinéticos y reológicos en una ruta estrictamente biológica; empleando la microalga *Chlorella vulgaris* para la producción de lípidos y la lipasa *Acrílica*

cándida antártica B como biocatalizador para el proceso de transesterificación, aplicada a residuos grasos y aguas residuales de la industria avícola, obteniendo un biodiesel de calidad que cumple con las normas internacionales ASTM y con rendimientos superiores al 83%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abinandan, S. & Shanthakumar, S., 2015. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 52, pp. 123-132.
- Aguilar-May, B. & Sánchez-Saavedra, M. d. P., 2009. Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of Applied Phycology*, Volumen 21, pp. 353-360.
- Alicke, A. A., Leopércio, B. C., Marchesini, F. H. & de Souza Mendes, P. R., 2015. Guidelines for the rheological characterization of biodiesel. *Fuel*, Volumen 140, pp. 446-452.
- Alpha Pollardo, A. y otros, 2018. Solvent effect on the enzymatic production of biodiesel from waste animal fat. *Journal of Cleaner Production*.
- Alvarado, D., Buitrago, E., Solé, M. & Khenia, F., 2008. Experimental evaluation of a composted seaweed extract as microalgal culture media. *Aquaculture International*, 16(1), pp. 85-90.
- Aminian, A. & ZareNezhad, B., 2018. Accurate predicting the viscosity of biodiesels and blends using soft computing models. *Renewable Energy*, Mayo, Volumen 120, pp. 488-500.
- Andrade R., C. E., Vera B., A. L., Cárdenas L., C. H. & Morales A., E. D., 2009. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad de Zulia*, 32(2), p. 10.
- Ardilla Álvarez, A. M. y otros, 2017. Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. *Tecno Lógicas*, junio, 20(38), pp. 85-96.
- Arias Gilart, R. y otros, 2018. Efecto del tratamiento magnético en el comportamiento reológico del diésel. *Tecnología Química*, Agosto.38(2).

- Arias Peñaranda, M. T., Cañizares Villanueva, R. O. & Martínez Roldán, A. d. J., 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, Enero, 18(1), pp. 43-68.
- Arias Perez, D. E., Teuta Ramirez, C. A. & Parra, P. J., 2011. Caracterización de las propiedades del biodiesel de girasol bajo la Norma NTC de 100/04 y medición de poder calorífico. *AVANCES Investigación en Ingeniería*, 8(2), pp. 73-80.
- Ayatollahi, S. Z., Esmaeilzadeh, F. & Mowla, D., 2020. Integrated CO₂ capture, nutrients removal and biodiesel production using *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, p. 104763.
- Azhand, N., Sadeghizadeh, A. & Rahimi, R., 2020. Effect of superficial gas velocity on CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an Airlift photobioreactor with external sparger. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volumen 8, p. 104022.
- Azizi, K., Moraveji, M. K. & Najafabadi, H. A., 2018. A review on bio-fuel production from microalgal biomass by using pyrolysis method. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 82, pp. 3046-3059.
- Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D. & López-Chuken, U. J., 2017. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), pp. 417-427.
- Benavente Valdes , J. y otros, 2012. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* , Junio.4(7).
- Benavente-Valdés, J. R. y otros, 2016. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, Volumen 10, pp. 117-125.
- Cadahia Fernández, E., 2015. *Efectos de los herbicidas derivados de piridina, picloram y 3,6-D en la nitrificación y en la fijación de nitrógeno en la simbiosis Rhizobium-Leguminosa*, Madrid: s.n.

Cámara de diputados del H. Congreso de la Unión, 2018. Ley General de cambio climático. *Diario Oficial de la federación*, 19 Enero, p. 53.

Carrasquero-Ferrer, S. J., Rincón-Lizardo, N. C., Díaz-Montiel, A. R. & Pire-Sierra, M. C., 2014. Monitoreo de la remoción biológica de nitrógeno en efluentes de tenerías usando un reactor por carga secuencial. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 15(2), pp. 287-298.

CE-CCA-001-89, 1989. Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. *Diario Oficial de la Federación*, 13 Diciembre.

Chen, W. y otros, 2017. Crystallization behaviors and rheological properties of biodiesel derived from methanol and ethanol. *Fuel*, Volumen 207, pp. 503-509.

Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W. & Das, K., 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents. *Bioresource Technology*, 101(9), pp. 3097-3105.

Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A. & C. Das, K., 2009. Biomass production potential of wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Science*, 4 February, 10(2), pp. 518-532.

Chol-Jin, Y., Kum-Ok, H., Song-Su, H. & Hyong-Guan, R., 2019. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and Bioenergy*, August, Volumen 127, pp. 105-277.

Contesini, F. J. y otros, 2020. Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. *Catalysts*, 10(9), p. 1032.

Converti, A., Casazza A., A., Ortiz Y., E. & Del Borghi, M., 2009. 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: Process Intensification*, June, 48(6), pp. 1146-1151.

Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A. & Corredor Vargas, A. M., 2015. Anaerobic bacteria: processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet. *Nova*, 13(24), pp. 55-81.

Daneshvar , E. y otros, 2018. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. *Bioresource Technology*, Mayo, Volumen 255, pp. 104-110.

de Mendonça, H. V. y otros, 2018. Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: Comparison between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment*, Volumen 633, pp. 1-11.

de-Bashan, L. E. y otros, 2008. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*, Volumen 99, pp. 4980-4989.

Dennis, Y. C., Leung, Wu, X. & Leung, M. K. H., 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, Volumen 87, p. 1083–1095.

Derner, R. B. y otros, 2006. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural*, 36(6), pp. 1959-1967.

Domínguez-Viveros, J. y otros, 2013. Adjustment of nonlinear models and estimation of growth parameters in tropicane cattle. *Agrociencia (Montecillo)*, 47(1), pp. 25-34.

Doshi, A., Pascoe, S., Coglean, L. & Rainey, T. J., 2016. Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29 Junio. pp. 329-337.

Fazal, M. A. y otros, 2018. Influence of copper on the instability and corrosiveness of palm biodiesel and its blends: An assessment on biodiesel sustainability. *Journal of Cleaner Production*, Volumen 171, pp. 1407-1414.

Fazal, T. y otros, 2017. Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 82, pp. 3107-3126.

Fong, M. J. B. y otros, 2019. Catalytic pyrolysis of *Chlorella vulgaris*: Kinetic and thermodynamic analysis. *Bioresource Technology*, Octubre.289(121689).

Forero Cujíño, M. A., Montengro Ruiz, L. C., Pinilla Agudelo, G. A. & Melgarejo Muñoz, L. M., 2016. Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) and *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) in Calcium Alginate Beads. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), pp. 437-442.

García-Muentes, A. y otros, 2018. Propiedades fisicoquímicas del aceite y biodiesel producido a partir de *Jatropha curcas* L. en la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista Cubana de Química*, 30(1), pp. 142-158.

Garibay Hernández, A. y otros, 2009. Biodiesel a Partir de Microalgas. *Bio Tecnología*, 13(3).

Gebremariam, S. N. & Marchettie, J. M., 2018. Economics of biodiesel production: Review. *Energy Conversion and Management*, Volumen 168, pp. 74-84.

Gemma, V., Carrero, A., Rodríguez, R. & del Peso, G. L., 2017. Heterogeneous-catalysed direct transformation of microalga biomass into Biodiesel-Grade FAMES. *Fuel*, Volumen 200, pp. 590-598.

Gong, Y. & Jiang, M., 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol Lett*, Volumen 33, pp. 1269-1284.

González Delgado, Á. y otros, 2012. Adaptación del método Bligh & Dyer a la extracción de lípidos de microalgas colombianas para la producción de biodiesel de tercera generación. *Publicaciones e Investigación*, Volumen 6, pp. 25-34.

Gordiychuk, A., Svanera, M., Benini, S. & Poesio, P., 2016. Size Distribution and Sauter Mean Diameter of Micro Bubbles for a Venturi Type Bubble Generator. *Exp. Therm. Fluid Sci.*, Volumen 70, pp. 51-60.

Gotor, V., 2002. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *Journal of Biotechnology*, Issue 96, pp. 35-42.

Griffiths, M. J. & Harrison, S. T. L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), pp. 493-507.

- Guo, J., Sun, S. & Liu, J., 2020. Conversion of waste frying palm oil into biodiesel using free lipase A from *Candida antarctica* as a novel catalyst. *Fuel*, Volumen 267, p. 117323.
- Gutierrez, E., Travaglini, A., Uzcategui, G. & Caldera, Y., 2012. Desinfección de aguas residuales de una industria avícola para su reutilización. *Revista Tecnocientífica URU*, Volumen 3, pp. 47-54.
- Hajjari, M., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M. & Ghanavati, H., 2017. A review on the prospects of sustainable biodiesel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiesel utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Enero, Issue 72, pp. 445-464.
- Hasan, M. M. & Rahman, M. M., 2017. Performance and emission characteristics of biodiesel–diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 74, pp. 938-948.
- Hernández Pérez, A. & Labbé, J. I., 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), pp. 157-173.
- Huang, Y., Lou, C., Luo, L. & Wang, X. C., 2021. Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic *Chlorella vulgaris* growth under stably controlled nutrient conditions. *Science of the Total Environment*, Volumen 752, p. 141747.
- Hu, D. y otros, 2021. Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* co-cultivation with landfill leachate for pollutant removal and lipid production. *Bioresource Technology*, Volumen 342, p. 12600.
- Jämsä, M. y otros, 2017. Nutrient removal and biodiesel feedstock potential of green alga UHCC00027 grown in municipal wastewater under Nordic conditions. *Algal research*, Issue 26, pp. 65-73.
- Jenicek, P., Svehla, P., Zabranska, J. & Dohanyos, M., 2004. Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification. *Water science and technology*, 49(5-6), pp. 73-79.
- Karthikeyan, S., Periyasamy, M. & Prathima, A., 2020. Performance characteristics of CI engine using *Chlorella Vulgaris* microalgae oil as a pilot dual fuel blends. *Materials Today: Proceedings*, Volumen 33, pp. 3277-3282.

Kassem, Y. & Çamur, H., 2017. Prediction of biodiesel density for extended ranges of temperature and pressure using adaptive neuro-fuzzy inference system (ANFIS) and radial basis function (RBF). *Procedia Computer Science*, Volumen 120, pp. 311-316.

Khalaji, M. y otros, 2021. Treatment of dairy wastewater by microalgae *Chlorella vulgaris* for biofuels production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, pp. 1-7.

Knobelsdorf, M. J., 2005. *Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP*, s.l.: s.n.

Knothe, G., 2012. Production and Properties of Biodiesel from Algal Oils. *Algae for Biofuels and Energy*, Volumen 5, pp. 207-221.

Knothe, G. & Steidley, K. R., 2005. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel*, Volumen 84, pp. 1059-1065.

Lam, M. K. y otros, 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, Volumen 103, pp. 197-207.

Lee, C.-M. y otros, 2011. Production Potential of *Chlorella vulgaris* Under Different CO₂ Concentrations and Light Intensities. *Journal of Animal Science and Technology*, 53(3), pp. 261-268.

López-Legarda, X. y otros, 2017. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), pp. 180-198.

López-Pacheco, I. Y. y otros, 2019. Combination of nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 1 Agosto, Volumen 676, pp. 356-367.

Madlener, K., Frey, B. & Ciezki, H. K., 2009. Generalized Reynolds Number for Non-Newtonian Fluids. *Prog. Propulsion Phys.*, Volumen 1, pp. 237-250.

- Malvis, A. y otros, 2019. Integrated process for olive oil mill wastewater treatment and its revalorization through the generation of high added value algal biomass. *Water Research*, Volumen 151, pp. 332-342.
- Martínez, M., Parra, J., Vera, M. A. & Vera, A., 2016. Parámetros de calidad del Aceite de las Semillas de *Azadirachta indica* (neem).. *CENIC*, Volumen 47, pp. 70-74.
- Mehtani, J. y otros, 2017. Augmented lipid accumulation in ethyl methyl sulphonate mutants of oleaginous microalga for biodiesel production. *Bioresource Technology*, Volumen 242, pp. 121-127.
- Mellado Duran, E., Escobar Niño, A., Cánovas López, D. & Luna Martínez, D., 2014. *Cepa microbiana Terribacillus SP-AE2B 122 con capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación y usos de la misma*. España, Patente nº ES 2 510 765 A1.
- Méndez Contreras, J. M. y otros, 2016. Rheological behavior of physicochemical sludges during methanogenesis suppression and hydrogen production at different organic loading rates. *Journal of Environmental Science and Health*, Marzo, 51(7), pp. 515-522.
- Miranda Zoppas, F. y otros, 2012. Evaluación de la nitrificación en el tratamiento de las aguas residuales de curtido con bioreactor de membrana durante la aclimatación del lodo. *Centro de Eventos da PUCRS*, p. 10.
- Mohd Khazaai, S. N. y otros, 2021. Rapid determination of diesel/biodiesel blend ratio using refractive index, density, and kinematic viscosity measurements. *Biomass Conversion and Biorefinery*, pp. 1-7.
- Morales Amaral, M. d. M., 2016. *Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos*, s.l.: s.n.
- Mujtaba, G., Rizwan, M. & Kisay, L., 2017. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Volumen 49, pp. 145-151.

Narváez Rincón, P. C., Sánchez, F. J., Torres, J. A. & Ponce de León, L. F., 2004. Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos: Variables asociadas al proceso de transformación. *Ingeniería e Investigación*, 24(002), pp. 41-50.

Nielsen†, A. V. F., Andric, P. & Nielsen, P. M., 2014. Activity and Spatial Distribution of Candida antarctica Lipase B Immobilized on Macroporous Organic Polymeric Adsorbents. *Langmuir*, 30(19), pp. 5429-5434.

NMX-AA-003-1980, s.f. *Norma Mexicana "Aguas Residuales.-Muestreo"*. s.l.:s.n.

NOM-001-SEMARNAT-1996, 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

NOM-127-SSA1-1994, 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. *Diario Oficial de la Federación*, 16 Diciembre.

NOM-CCA-022-ECOL/1993, 1993. NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-022-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de matanza de animales y empacado de cárnicos. *Diario Oficial de la Federación*, 18 Octubre.

Oni, B. A., Sanni, S. E., Ezurike, B. O. & Okoro, E. E., 2022. Effect of corrosion rates of preheated Schinzochytrium sp. microalgae biodiesel on metallic components of a diesel engine. *Alexandria Engineering Journal*, Volumen 61, pp. 7509-7528.

Park, K. Y. y otros, 2013. Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volumen 85, pp. 598-602.

Peña, 2014.

PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, 2018. Proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. *Diario Oficial de la Federación*, 05 Enero.

Qunju, H. y otros, 2015. The influence of cultivation period on growth and biodiesel properties of microalga Nannochloropsis gaditana 1049. *Bioresource Technology*, Issue 192, pp. 157-164.

Ramírez-López, C., Chairez, I. & Fernández-Linares, L., 2016. A novel culture medium designed for the simultaneous enhancement of biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris* UTEX 26. *Bioresource Technology*, Volumen 212, pp. 207-216.

Ramos, R. & Pizarro, R., 2018. Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), pp. 75-86.

Rehan, M. y otros, 2018. Waste to biodiesel: A preliminary assessment for Saudi Arabia. *Bioresource Technology*, Volumen 250, pp. 17-25.

Robles-Heredia, J. C. y otros, 2016. Evaluación de crecimiento celular, remoción de nitrógeno y producción de lípidos por *Chlorella vulgaris* a diferentes condiciones de aireación en dos tipos de fotobiorreactores anulares. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), pp. 361-377.

Rojas González, A., Girón, G. E. & Torres Castañeda, H. G., 2010. Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión - catálisis enzimática. *Ingeniería e Investigación*, 30(1), pp. 17-21.

Rojas Morales, J. L., Gutiérrez-González, E. C. & Colina Andrade, G. d. J., 2016. Obtención y caracterización de carbón activado obtenido de lodos de plantas de tratamiento de agua residual de una industria avícola. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XVII(4), pp. 453-462.

Safi, C. y otros, 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, July, Volumen 35, pp. 265-278.

Saluja, R. K., Vineet, K. & Radhey, S., 2016. Stability of biodiesel – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 62, pp. 866-881.

Sandoval Herrera, J. A., Malo Malo, B. O., Cartagena Arévalo, J. C. & Rubio Fernández, D., 2018. Evaluación a nivel laboratorio de la capacidad de remoción de materia orgánica de *Chlorella vulgaris* en las aguas residuales de la PTAR Salitre. *Mutis*, 8(1), pp. 34-42.

- Santos, S. M. y otros, 2020. Flash point prediction: Reviewing empirical models for hydrocarbons, petroleum fraction, biodiesel, and blends. *Fuel*, Volumen 263, p. 116375.
- Sbihi, H. M., Nehdi, I. A., Tan, C. P. & Al-Resayes, a. I., 2014. Production and characterization of biodiesel from Camelus dromedarius (Hachi) fat. *Energy Conversion and Management*, Volumen 78, pp. 50-57.
- Shah, S. H. y otros, 2018. Potential of microalgal biodiesel production and its sustainability perspectives in Pakistan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 81, pp. 76-92.
- Silveira-Font, Y. y otros, 2018. Variación de la composición de pigmentos de Chlorella vulgaris Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 30(1), pp. 55-67.
- Sirin, S., Clavero, E. & Salvadó, . J., 2013. Potential pre-concentration methods for Nannochloropsis gaditana and a comparative study of pre-concentrated sample properties. *Bioresource Technology*, Volumen 132, pp. 293-304.
- Sivaramakrishnan, R. & Incharoensakdi, A., 2017. Microalgae as feedstock for biodiesel production under ultrasound treatment - A review. *Bioresource Technology*.
- Swain, K. C., 2014. Biofuel Production in India: Potential, Prospectus and Technology. *Fundamentals of renewable energy and applications*, 4(1).
- Tejada Benítez , L., Henao Argumedo , D., Alvear Alayón , M. & Castillo Saldarriaga , C. R., 2015. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería*, Agosto , 24(39), pp. 43-54.
- Tejada-Benítez, L., Henao-Argumedo, D. & Alvear-Alayón, M., Castillo-S, 2015. Caracterização e perfil lipídico de azeites de microalgas. *Revista facultad de ingeniería*, 24(39), pp. 43-54.
- Valderrama, L. T. y otros, 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga Chlorella vulgaris and the macrophyte Lemna minuscula. *Water Research*, 36(17), pp. 4185-4192.

Vásquez-Villalobos , V., Artega Gutiérrez , P., Chanamé Acevedo , K. & Esquivel Torres , A., 2013. Mathematical modeling and through artificial neural networks of the Spirulina sp. growth in a photobioreactor with fluorescent light source and solid state lighting. *Scientia Agropecuaria*, 20 Septiembre, 4(3), pp. 199-209.

Vásquez-Villalobos, V., Artega Gutiérrez, P., Chanamé Acevedo, K. & Esquivel Torres, A., 2013. Mathematical modeling and through artificial neural networks of the Spirulina sp. growth in a photobioreactor with fluorescent light source and solid state lighting. *Scientia Agropecuaria*, 4(3), pp. 199-209.

Ventura, M. y otros, 2018. Determination of the biodiesel content in diesel/biodiesel blends by using Determination of the biodiesel content in diesel/biodiesel blends by using. *Fuel*, Issue 212, pp. 309-314.

Vo, H. N. P. y otros, 2020. Selective carbon sources and salinities enhance enzymes and extracellular polymeric substances extrusion of Chlorella sp. for potential co-metabolism. *Bioresource Technology*, Volumen 303, p. 122877.

Xiao, M. y otros, 2019. Characterization of cometabolic degradation of p-cresol with phenol as growth substrate by Chlorella vulgaris. *Bioresource Technology*, Volumen 281, pp. 296-302.

Yodsuwan, N., Kamonpatana, P., Chisti, Y. & Sirisansaneeyakul, S., 2018. Ohmic heating pretreatment of algal slurry for production of biodiesel. *Journal of Biotechnology*, Issue 267, pp. 71-78.

Yu, D. y otros, 2021. Immobilized Candida antarctica lipase B (CALB) on functionalized MCM-41: Stability and catalysis of transesterification of soybean oil and phytosterol. *Food Bioscience*, Abril, Volumen 40, p. 100906.

Yun-Ming, Z., Hui , C., Chen-Liu, H. & Qiang , W., 2013. Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga Chlorella sorokiniana C3. *PLOS ONE*, July.8(7).

Yusuf, N., Kamarudin, S. & Yaakub, Z., 2011. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, Volumen 52, pp. 2741-2751.

Zhang , Q., Zhan , J.-J. & Hong , Y., 2015. The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient. *Desalination and Water Treatment*, March .pp. 1-6.

Zhang, J. y otros, 2020. Chlorella vulgaris heterotrophic colony development and interaction. *Algal Research*, Volumen 49, p. 101907.

Zhang, X. y otros, 2013. Influence of cell properties on rheological characterization of microalgae suspensions. *Bioresource Technology*, Volumen 139, pp. 209-213.

PRODUCTOS ACADÉMICOS

1. Gutierrez-Casiano N., Hernández-Aguilar E., Baños-Castro Z., Cortés-Robles G, Méndez-Contreras J. M. (2020). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* aplicada en el tratamiento de agua residual avícola relacionada con la intensidad de luz y carga orgánica. AMIDIQ. Avances en Ingeniería Química, I(2), AMB 231-236. ISSN: 2683-2925
2. Gutierrez-Casiano N., Rosas-Rivera D. L., Hernández-Aguilar E, Alvarado-Lassman A., Méndez-Contreras J. M. (2020). Evaluación de la cantidad de luz y aire en la producción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* en Medio Bold Basal. AMIDIQ. Avances en Ingeniería Química, I(2), BIO 271-275. ISSN: 2683-2925
3. Mena-Vázquez I., Gutiérrez-Casiano N., Hernández-Aguilar E., Aguilar Lasserre A. A., Méndez-Contreras J. M. (2021). Extracción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* con solventes polares y no polares. AMIDIQ. Avances en Ingeniería Química. ISSN: 2683-2925
4. Gutiérrez-Casiano N., Rodríguez Ramírez L., Hernández-Aguilar E., Alvarado Lassman A., Méndez-Contreras J. M. Evaluación de flocculantes inorgánicos en la cosecha de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*. Journal CIM
5. Mena-Vázquez I., Gutiérrez-Casiano N., Hernández-Aguilar E., Castro Salas R. I., Méndez-Contreras J. M. (2022). Evaluación de la floculación de biomasa de *Chlorella vulgaris* aplicando sales inorgánicas. AMIDIQ. Avances en Ingeniería Química. ISSN: 2683-2925
6. Gutiérrez-Casiano N., Chávez Méndez N. E., Hernández-Aguilar E., Vicente Martínez J., Méndez-Contreras J. M. Obtención de biodiesel por transesterificación de lípidos con lipasa *Acrílica cándida antártica B*. Journal CIM
7. Gutiérrez-Casiano, N., Hernández-Aguilar, E., Alvarado-Lassman, A., & Méndez-Contreras, J. M. (2022). Removal of carbon and nitrogen in wastewater from a poultry processing plant in a photobioreactor cultivated with the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 57(7), 620-633.