

---

## PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS: PARÁMETROS DEL CULTIVO QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS

### Biodiesel Production from Microalgae: Cultivation Parameters that Affect Lipid Production

MARTHA TRINIDAD ARIAS PEÑARANDA<sup>1</sup>, M.Sc.; ALFREDO DE JESÚS MARTÍNEZ ROLDÁN<sup>1</sup>, M.Sc.; ROSA OLIVIA CAÑIZARES VILLANUEVA<sup>1</sup>, Ph. D.

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Ciudad de México, D.F., México.

Autor de correspondencia: Rosa Olivia Cañizares Villanueva.  
rcanizar@cinvestav.mx. Tel.: 52 5 557 473 800, ext.: 4342.  
Fax: 52 5 557 473 800, ext.: 3315.

Presentado 3 de septiembre de 2012, aceptado 19 de noviembre de 2012, correcciones 22 de enero de 2013.

#### RESUMEN

Las microalgas poseen la capacidad para mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> y producir lípidos, por lo que se consideran con potencial para la obtención de biocombustibles de tercera generación. La presente revisión proporciona información actualizada de la influencia de las condiciones de cultivo, sobre la obtención de lípidos con una productividad elevada y perfil adecuado para la producción de biodiesel, se proporciona una síntesis de resultados de investigaciones realizadas en los últimos 13 años en diversas partes del mundo. En la literatura consultada, los autores concluyen que aunque el comportamiento de las microalgas ante condiciones de estrés fisiológico es variable entre especies; la limitación de nutrientes especialmente nitrógeno y fósforo, asociado al crecimiento heterotrófico o a altas intensidades luminosas en fototrofia se consideran como las estrategias más eficientes para incrementar el contenido de lípidos en las microalgas, en particular de triglicéridos constituidos por ácidos grasos saturados y monoinsaturados, ideales para la producción de biodiesel. De igual forma, señalan que la presencia de pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> y la cosecha de la biomasa en la fase estacionaria de crecimiento, incrementan el contenido de lípidos y disminuyen el número de insaturaciones de los ácidos grasos que lo conforman.

**Palabras clave:** biocombustibles, microalgas, lípidos, ácidos grasos.

#### ABSTRACT

The microalgae have the capacity to mitigate CO<sub>2</sub> emissions and to produce lipids, which are considered with potential to obtain third-generation biofuel. This review

provides updated information of the influence of culture conditions on the lipids production with high productivity and profile suitable for the biodiesel production. This document presents a compilation of research conclusions over the last 13 years around the world. In the literature consulted, the authors conclude that although the behavior of microalgae at physiological stress conditions, varies between species; the nutrients limitation, especially nitrogen and phosphorus, associated with heterotrophic growth or high irradiances in phototrophy are considered the most efficient strategies to increase the lipid content in microalgae, particularly triglycerides (consisting of saturated and monounsaturated fatty acids), which are excellent for the production of biodiesel. Also, it is reported that the lipid content increase and the number of unsaturated fatty acids decrease with the addition of small amounts of CO<sub>2</sub> and harvesting the biomass in the stationary phase of growth.

**Keywords:** biofuels, microalgae, lipids, fatty acids.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una tendencia internacional hacia la búsqueda de combustibles más limpios y nuevas fuentes de energía de baja emisión de carbono, como la energía solar, la térmica, la fotovoltaica, la hidroeléctrica, la geotérmica, la eólica y los biocombustibles, entre otras; las cuales están siendo evaluadas y se encuentran en diferentes fases de estudio y aplicación, cada una con sus propias ventajas y problemas. En este escenario, se espera que los biocombustibles líquidos, biodiesel y bioetanol puedan sustituir al gasóleo y la gasolina respectivamente (Posten y Schaub, 2009), promuevan nuevas fuentes de empleo en las zonas rurales, reduzcan las emisiones de gases efecto invernadero y aumenten la seguridad de abastecimiento energético (Mata *et al.*, 2010). El biodiesel es un combustible sustituto del gasóleo o diesel de petróleo, compuesto por una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga (C<sub>14</sub> - C<sub>22</sub>), obtenidos por transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o lípidos de microalgas (Miao y Wu, 2006; Demirbas, 2009). El uso del biodiesel como combustible puede ser puro (100 % o B100) o mezclado con diesel derivado del petróleo (BXX - donde XX indica el porcentaje de biodiesel en la mezcla) y suele emplearse en cualquier motor diesel con poca o ninguna modificación y no requiere nueva infraestructura de abastecimiento (Demirbas, 2009). El uso de biodiesel como recurso energético resulta atractivo porque se deriva de una fuente renovable que podría ser suministrada de manera sostenible (Huang *et al.*, 2010), por lo que disminuye la dependencia al petróleo y presenta diferentes ventajas frente al diesel como que es biodegradable y menos tóxico (Miao y Wu, 2006; Xue *et al.*, 2006), además no contiene compuestos aromáticos, tiene un perfil más favorable de gases de combustión (tal como una baja emisión de monóxido de carbono, azufre, partículas en suspensión e hidrocarburos sin quemar) (Halek *et al.*, 2009; Widjaja *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010); su punto de ignición es relativamente alto (150 °C) lo que lo hace menos volátil y más seguro de transportar o manejar; su número de cetano es mayor; lo que otorga ventajas al proceso de combustión; posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste de los motores y extiende su vida útil (Huang *et al.*, 2010). Sin embargo, las emisiones de óxidos

de nitrógeno pueden aumentar y el uso de biodiesel puro (B100) puede generar problemas de arranque en frío, por lo que el tanque de combustible requeriría calefacción en climas con temperaturas bajas y la sustitución de algunos materiales empleados en mangueras, juntas, etc. por elastómeros compatibles con el biodiesel (Rosillo, 2006).

El biodiesel ha ido ganando popularidad mundial como fuente de energía renovable debido a sus ventajas económicas, ambientales y sociales. Los cinco principales productores de biodiesel en el mundo son Estados Unidos, Alemania, Francia, Argentina y Brasil. Se espera que con los incentivos de los gobiernos para aumentar la producción y consumo de combustibles renovables, la producción mundial de biodiesel se incremente de 21,4 billones de litros en el 2011 a 45,3 billones de litros en el 2020 (Global Data, 2010).

Aunque desde hace más de veinte años se han venido realizando investigaciones para obtener biodiesel a partir de aceite microalgal (Nagle y Lemke, 1990), en la última década este tema ha ganado mucha fuerza, especialmente en el sector privado y académico. En el entorno laboratorio, investigadores de todo el mundo han demostrado el potencial de varias especies de microalgas como materia prima para producir biodiesel, se destaca el trabajo financiado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos, sobre especies acuáticas, realizado de 1978 a 1996 por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en inglés) con el objetivo de producir biodiesel a partir de aceite de microalgas cultivadas en estanques, utilizando como fuente de carbono el CO<sub>2</sub> liberado en centrales termoeléctricas. En dicha investigación se lograron avances importantes en la manipulación del metabolismo de las algas y en la ingeniería de los sistemas de producción (Sheehan *et al.*, 1998). Estos y otros resultados han despertado el interés de algunas compañías por invertir en la búsqueda de estrategias de cultivo de especies de microalgas denominadas oleaginosas para producir biocombustibles para diferentes usos. Estas empresas se encuentran ubicadas en Estados Unidos (78 %), Europa (13 %) y el resto del mundo (9 %) (Singh y Gu, 2010).

Mientras que algunas compañías como Solazyme ([www.solazyme.com](http://www.solazyme.com)), Aurora Algae ([www.aurorainc.com](http://www.aurorainc.com)), Bionavitas ([www.bionavitas.com](http://www.bionavitas.com)), Seambiotic ([www.seambiotic.com](http://www.seambiotic.com)) y Solix ([www.solixbiofuels.com](http://www.solixbiofuels.com)) se han enfocado en la búsqueda de estrategias de cultivo para mejorar la productividad de los lípidos en las microalgas, otras como OriginOil (<http://www.originoil.com>) están interesadas en encontrar métodos de cosecha de la biomasa, extracción del aceite o en los procesos para producir el combustible, incluso para aviones como Algae.Tec Ltd. (<http://algaetec.com.au>), Dynamic Fuels ([www.dynamicfuelsllc.com](http://www.dynamicfuelsllc.com)), Solazyme (<http://solazyme.com>), General Atomics (<http://www.ga.com>); la gran mayoría trabajando bajo el concepto de biorefinería para aprovechar de manera integral la biomasa y minimizar costos.

Actualmente en el mundo se están invirtiendo muchos recursos para investigación, dirigida a minimizar los costos de la materia prima para la obtención de biodiesel (Li *et al.*, 2007), algunos estudios recientes se han inclinado en el uso de semillas de jatropha y karanja y de microalgas como fuente de lípidos, sin embargo, para que cualquiera de ellas pueda sustituir eventualmente los combustibles fósiles debe tener características como ser competitiva en cuanto a su precio con respecto a los combustibles derivados del petróleo, requerir poca cantidad de suelo y agua, que contribuya a mejorar la calidad del aire (por ejemplo, que en su proceso de producción se utilice CO<sub>2</sub>), que exista en cantidad suficiente para que dicha producción tenga un impacto

significativo en la demanda y que proporcione una ganancia neta de energía sobre la demandada para producirlo (Demirbas, 2009; Meng *et al.*, 2009). Un aspecto de vital importancia es que el biocombustible obtenido cumpla con las especificaciones de calidad internacionales (ASTM D6751; EN 14214). El uso de microalgas podría cumplir estas condiciones, y por lo tanto, contribuir de manera significativa a la resolución de la demanda de energía primaria y al mismo tiempo, proporcionar beneficios ambientales a través de la captura de CO<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2008; Brennan y Owende, 2010).

Las ventajas del uso de microalgas para la obtención de biodiesel ya han sido demostradas, sin embargo, aún no se ha definido una cepa ideal, dada la diversidad de factores que influyen en la productividad de los lípidos y por ende en el costo de producción del biodiesel.

En esta revisión se muestran de manera cronológica los esfuerzos que se han venido invirtiendo en los últimos 20 años para determinar la influencia de algunos parámetros del cultivo de microalgas sobre la productividad de los lípidos y el perfil de ácidos grasos que los componen.

#### **MICROALGAS COMO FUENTE DE LÍPIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL**

El interés en las microalgas para la producción de biodiesel se debe a su alto contenido de lípidos en algunas especies y al hecho de que la síntesis de estos, especialmente de triglicéridos (TG) no polares (que son el mejor sustrato para la producción de biodiesel), puede ser manipulada por cambios de las condiciones de cultivo. Adicionalmente, las microalgas poseen algunas ventajas sobre otras materias primas disponibles, entre las que se pueden mencionar:

- Mayor eficiencia fotosintética que las plantas superiores (Meng *et al.*, 2009; Posten y Schaub, 2009), logrando convertir entre el 3 y el 8 % de la energía solar en biomasa, mientras que el rendimiento observado en las plantas es de aproximadamente un 0,5 % (Lardon *et al.*, 2009).
- Tasa de crecimiento elevada, duplicando su biomasa en aproximadamente 24 horas (Meng *et al.*, 2009).
- Periodos de cosecha muy cortos (menores a diez días dependiendo del proceso), lo que permite múltiples o continuas cosechas a diferencia de las plantas que se cosechan una o dos veces por año (Vyas *et al.*, 2010).
- Cálculos teóricos estiman que las microalgas tienen el potencial para producir mayor cantidad de biomasa y de aceite por hectárea que cualquier planta oleaginosa (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010).
- Fácil cultivo, crecen casi en cualquier lugar y solo necesitan luz del sol y algunos nutrientes. Pueden cultivarse en zonas áridas y semi-áridas, donde no pueden desarrollarse cultivos agrícolas, pueden utilizar agua no potable y su cultivo no requiere la adición de herbicidas o pesticidas (Avagyan, 2008).
- Capaces de fijar grandes cantidades de CO<sub>2</sub> (Amin, 2009; Sydney *et al.*, 2010), su demanda estequiométrica de CO<sub>2</sub> es de aproximadamente 1,7 kg de CO<sub>2</sub>/kg de biomasa seca (Packer, 2009; Posten y Schaub, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009), lo que permitiría acoplar su producción a una corriente de gases de combustión industrial para disminuir el efecto invernadero y contribuir al restablecimiento del equilibrio térmico del planeta (Lim y Teong, 2010).

- Capacidad para utilizar los nutrientes de aguas residuales en su crecimiento (especialmente nitrógeno y fósforo) (Xue *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Chinnasamy *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2010a, Xin *et al.*, 2010b), podría disminuir el costo del medio de cultivo y evitar la descarga de estos nutrientes a cuerpos de agua.
- La biomasa residual, posterior a la extracción de los lípidos, encuentra aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica, agropecuaria e incluso en la producción de alcoholes combustibles y en la generación de energía (Wang *et al.*, 2008; Zamalloa *et al.*, 2012)

Aun cuando las microalgas tienen tasas de crecimiento superiores y su fotosíntesis es más eficiente que la de las plantas terrestres (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008), un obstáculo importante para la producción de su aceite es el costo relativamente elevado, lo cual se espera superar con el avance tecnológico. El principal reto para el desarrollo de un proceso de producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas es la obtención de los lípidos a un costo competitivo, esto puede lograrse a través de la selección de las mejores cepas y condiciones de cultivo que permitan alcanzar la máxima productividad de lípidos con un perfil de ácidos grasos que otorgue calidad al biodiesel; la comercialización de diferentes subproductos como la torta de biomasa residual y la glicerina del proceso de transesterificación; y la disminución de los costos de cosecha, extracción de lípidos y su conversión a biodiesel (Demirbas, 2003; Brennan y Owende, 2010).

Un factor importante para el éxito global de la producción de biocombustibles, es la selección de la cepa de microalga, por lo que esta debe hacerse de acuerdo a factores como la productividad de los lípidos, expresada como cantidad de lípidos por unidad de volumen y de tiempo (g de lípidos/l.d) y su capacidad de adaptarse a ambientes extremos (temperatura, salinidad, pH, etc.) (Brennan y Owende, 2010).

Las microalgas bajo condiciones normales de cultivo presentan un contenido de lípidos que por lo general varía entre el 20 y el 50 % de su peso seco, sin embargo cuando son sometidas a situaciones de estrés, frecuentemente incrementan su fracción lipídica, por lo que se han reportado valores en rangos más amplios como se señala en la Tabla 1. Las especies predominantes de microalgas para la obtención de lípidos y su posterior conversión a biodiesel se encuentran dentro del grupo de las algas verdes. De acuerdo al Instituto de Investigación en Energía Solar (SERI por sus siglas en inglés), las especies más prometedoras son *Nannochloropsis salina* y *Dunaliella salina* por su elevada concentración de ácidos grasos. De igual forma, el NREL en Estados Unidos reportó que *Dunaliella*, *Scenedesmus* y *Chlorella* son los géneros más populares que se han cultivado con éxito a escala comercial para la obtención de biodiesel (Sheehan *et al.*, 1998). En la tabla 1 se presenta el porcentaje en peso de lípidos de algunas microalgas y se pueden apreciar diferencias significativas entre géneros y especies.

Aun cuando bajo condiciones de estrés algunas microalgas pueden alcanzar contenidos de lípidos superiores al 40 %, la calidad del biodiesel es considerablemente afectada por la composición de los ácidos grasos de los lípidos (Knothe, 2008). No todos los lípidos resultan satisfactorios para la obtención de biodiesel, por ejemplo, los lípidos producidos por *Botryococcus braunii* son en su mayoría grandes moléculas de hidrocarburos que resultan ideales para la producción de biocombustibles líquidos por medio de licuefacción o pirólisis, pero no pueden ser utilizados para la producción de biodiesel

Agua dulce / marina	Microalga	Lípidos (% peso seco)	Referencia
Agua dulce	<i>Chlorella emersonii</i>	63	Illman, <i>et al.</i> , 2000
	<i>Chlorella protothecoides</i>	11-59	Illman, <i>et al.</i> , 2000; Miao y Wu, 2006; Shen <i>et al.</i> , 2009, Shen <i>et al.</i> , 2010; Sforza <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	27	Tang <i>et al.</i> , 2011a
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	13-23	Illman, <i>et al.</i> , 2000; Zheng <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella saccharophila</i>	18 - 54	Isleten <i>et al.</i> , 2012; Zheng <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella</i> sp.	19 - 43	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Praveenkumar <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella vulgaris</i>	15 -58	Illman <i>et al.</i> , 2000; Converti <i>et al.</i> , 2009; Widjaja <i>et al.</i> , 2009; Yeh, <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	51	Liu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	35	Damiani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	26-38	Li <i>et al.</i> , 2008; Pruvost <i>et al.</i> , 2009; Popovich <i>et al.</i> , 2012; Santos <i>et al.</i> , 2012
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31	Shen <i>et al.</i> , 2009
	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	8- 12	Hernández <i>et al.</i> , 2009; Arias <i>et al.</i> 2011b; Castillo Ramírez <i>et al.</i> , 2011
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-43	Mandal y Mallick, 2009; Ho <i>et al.</i> , 2010; Tang <i>et al.</i> , 2011a
	<i>Scenedesmus rubescens</i>	27-43	Lin y Lin, 2011; Tan y Lin, 2011; Lin <i>et al.</i> , 2012
	<i>Scenedesmus</i> sp.	7 - 53	Hernández <i>et al.</i> , 2009; Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Xin <i>et al.</i> , 2010a; Xin <i>et al.</i> , 2010c
	Marina	<i>Chlorella minutissima</i>	57
<i>Chlorella</i> sp.		35- 52	Chiu <i>et al.</i> , 2008; Hsieh y Wu, 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>		57	Liu <i>et al.</i> , 2008
<i>Dunaliella tertiolecta</i>		24	Tang <i>et al.</i> , 2011b
<i>Nannochloris</i> sp.		40	Takagi <i>et al.</i> , 2000
<i>Nannochloropsis oculata</i>		8 -54	Chiu <i>et al.</i> , 2009; Converti <i>et al.</i> , 2009
<i>Nannochloropsis</i> sp.		24-60	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Pal <i>et al.</i> , 2011; Moazami <i>et al.</i> , 2012
<i>Tetraselmis suecica</i>		20 - 54	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Azma <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1. Contenido lipídico de algunas microalgas.

por transesterificación. Los triglicéridos ricos en ácidos grasos poliinsaturados son menos deseables para la producción de biodiesel, pues disminuyen el número de cetano y la estabilidad a la oxidación del combustible; mientras que triglicéridos ricos en ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el intervalo de C<sub>16</sub> - C<sub>20</sub>, especialmente en ácido oleico resultan ideales para la producción de biodiesel (Imahara *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009, Ramos *et al.*, 2009).

Hasta el momento no se conoce una cepa de microalga capaz de satisfacer al mismo tiempo todos los requisitos que permitan considerarla como materia prima óptima para la producción de biocombustibles. En este sentido, es pertinente la identificación

de una cepa adecuada de microalga para cultivo masivo y conocer su respuesta a diferentes condiciones de cultivo. En la producción comercial de microalgas resulta clave la adaptación de la cepa a su medio ambiente local, de tal forma que esta sea capaz de resistir tanto las condiciones ambientales como a los invasores locales, lo que constituye una clara ventaja de las cepas autóctonas sobre cepas introducidas, por tanto el aislamiento y caracterización de cepas locales para la producción de biocombustibles debe ser considerado.

#### ETAPAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS

El proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas (Fig. 1), se inicia con el cultivo de la cepa para la obtención de biomasa con una alta productividad de lípidos, seguido de la separación de la biomasa del medio de cultivo y posterior extracción de los lípidos para finalmente obtener el biodiesel por una reacción de transesterificación, de forma similar a como se produce a partir de cualquier aceite vegetal.

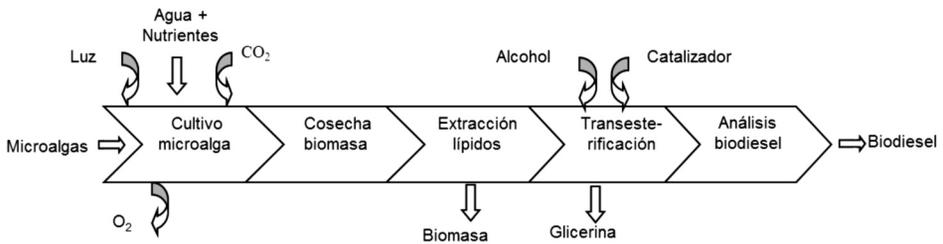


Figura 1. Etapas del proceso de obtención de biodiesel a partir de microalgas.

#### CULTIVO DE MICROALGAS

En general, las microalgas dependen para su crecimiento de un suministro de carbono y de una fuente de luz para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, como respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento diversos tipos de metabolismo (fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico, fotoheterotrófico). Al considerar el empleo de microalgas para la producción de biodiesel, es importante definir cuantitativamente la influencia de factores que intervienen en su crecimiento y que favorecen la producción de lípidos, así como su interrelación para poder manipularlos en la obtención de biomasa con determinadas características. Está demostrado que tanto el contenido de lípidos como el perfil de ácidos grasos de las microalgas varía no solo entre especies sino también en función de las condiciones del cultivo (Miao y Wu, 2006; Hu *et al.*, 2008; Converti *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010), del periodo de cosecha y la edad del cultivo (Mandal y Mallick, 2009; Widjaja *et al.*, 2009). Entre las condiciones de cultivo afectan factores abióticos como la concentración de nutrientes, la calidad y cantidad de luz, la temperatura, el O<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub>, el pH, la salinidad y factores operacionales como mezclado y la edad del cultivo. En la tabla 2 se presenta el contenido y productividad de lípidos de varias especies de microalgas bajo diversas condiciones de cultivo, en las siguientes secciones se discute en detalle el efecto de cada parámetro del cultivo sobre la acumulación de lípidos y el perfil lipídico.

Parámetro	Observaciones	Condiciones de cultivo	Especie microalgal	% Lípidos	P <sub>Lip</sub> (mg/l.d)	Referencia
Nutrientes	Limitación de nitrógeno (LN) incrementó % Lip y decreció P <sub>Lip</sub> debido a la disminución de biomasa	Salinidad (13 g/l) y 700 E/m <sup>2</sup> .s	<i>Nannochloropsis</i> sp.	35 - 48	410 - 360	Pal <i>et al.</i> , 2011
		20 L y 115 E /m <sup>2</sup> .s	<i>Nannochloropsis</i> sp.	15 - 50		Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
		Adición de hierro y CO <sub>2</sub>	<i>Chlorella vulgaris</i>	57		Liu <i>et al.</i> , 2008
		Fotoautótrofo con 2 % CO <sub>2</sub>	<i>Chlorella vulgaris</i>	24 - 63	56 - 51	Yeh y Chang, 2012
		1 etapa 20 días N normal	<i>Chlorella vulgaris</i>	29	13	
		2 etapas (20 días N normal y 17 días sin N)	<i>Chlorella vulgaris</i>	43	8	Widjaja <i>et al.</i> , 2009
		25 µE/m <sup>2</sup> .s	<i>Chlorella vulgaris</i>	18 - 40	29-28	Illman <i>et al.</i> , 2000
		Aire 1 l/min con 5 % CO <sub>2</sub>	<i>Chlorella emersonii</i>	29 - 63	28 - 25	
			<i>Chlorella minutissima</i>	31 - 57		
			<i>Chlorella protothecoides</i>	11 - 23		
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	20 - 22				
		NO <sub>3</sub> - (1,45 mM) y 270 E/m <sup>2</sup> .s	<i>Neochloris oleabundans</i>	23 - 37	126 - 65	Pruvost <i>et al.</i> , 2009
		17 días	<i>Scenedesmus rubescens</i>	43		Lin y Lin, 2011
		Efluente secundario (1,41 - 0,31 g/LN)	<i>Scenedesmus</i> sp.	14 - 31	8	Xin <i>et al.</i> , 2010a
		Fotoautótrofo - semicontinuo	<i>Tetraselmis suecica</i>	9 - 20		Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
		Semicontinuo NO <sub>3</sub> - (0,9 mM)	<i>Nannochloris</i> sp.	30 - 40	101 - 16	Takagi <i>et al.</i> , 2000
		2,5 - 0,2 g/l KNO <sub>3</sub> a 35 °C	<i>Spirulina maxima</i>	8 - 24		Macedo y Alegre, 2001
	LN no afectó % Lip	Aire/CO <sub>2</sub> (97/3), semicontinuo	<i>Chlorella</i> sp.	19	42	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
		4 días	<i>Scenedesmus</i> sp.	21	54	
	LN favoreció % Lip y P <sub>Lip</sub>	110 l a la intemperie	<i>Nannochloropsis</i> sp.	32 - 60	117 - 204	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
		N (0,075 g/l)	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8 - 15	10 - 16	Converti <i>et al.</i> , 2009
		Lote fotoautótrofo	<i>Chlorella vulgaris</i>	6 - 15	8 - 20	Converti <i>et al.</i> , 2009
		Dos etapas ( 16 y 4 días)	<i>Chlorella</i> sp.	31 - 43	40 - 54	Praveenkumar <i>et al.</i> , 2012
		Lote con 0,1 g/l Urea	<i>Chlorella</i> sp.	52	124	
		Lote alimentado 0,025 g/l Urea		45	123	Hsieh y Wu, 2009
		Semicontinuo 0,025 g/l Urea		45	139	

Parámetro	Observaciones	Condiciones de cultivo	Especie microalgal	% Lípidos	P <sub>lip</sub> (mg/l.d)	Referencia
	LN disminuyó % Lip	300 E/m <sup>2</sup> .s	<i>Haematococcus pluvialis</i>	35 - 33		Damiani <i>et al.</i> , 2010
	Limitación de nitrato y fosfato incrementa % Lip pero disminuye la P <sub>lip</sub>	P (1,3 mg/l) y N (2,5 mg/l) P (0,1 mg/l) y N (10 mg/l) P (20 M) y N (3 mM)	<i>Scenedesmus</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Scenedesmus rubescens</i>	30 53 39	9 14 29	Xin <i>et al.</i> , 2010c Tan y Lin, 2011
	Limitación combinada de nutrientes favoreció el % Lip y la P <sub>lip</sub>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (0,03 g/l), NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0,04 g/l), 2 etapas (12 con 10 % CO <sub>2</sub> y 9 días), (N, K, P, Fe), 2 etapas (16 y 4 días)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	13 - 43		Mandal y Mallick, 2009
Fuente de nitrógeno	NO <sub>3</sub> (2,4 g/l) lote alimentado	Heterotrófico (40 g/l glucosa) con: Inóculo heterotrófico. Inóculo fotoautotrófico	<i>Chlorella</i> sp. <i>Chlorella protothecoides</i>	12 - 39 31 - 41 51 59	35 - 79 40 - 49 654 850	Ho <i>et al.</i> , 2010 Praveenkumar <i>et al.</i> , 2012 Shen <i>et al.</i> , 2009; Shen <i>et al.</i> , 2010
NaNO <sub>3</sub>						
KNO <sub>3</sub>	Ext. Levadura (4g/l)	Heterotrófico (24 g/l Glucosa)	<i>Chlorella protothecoides</i>	50	3702	Xiong <i>et al.</i> , 2008
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1g/l peptona	Heterotrófico (20 g/l Glucosa)	<i>Chlorella saccharophila</i>	37	59	Isieten <i>et al.</i> , 2012
Urea	Urea 1,8 g/l	Fotoautotrófico	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31	24	Shen <i>et al.</i> , 2009
levadura	Amonio 1,5 mg/l	300 E/m <sup>2</sup> s1, salinidad 35 %	<i>Scenedesmus rubescens</i>	27	133	Lin y Lin., 2011
Glicina	NO <sub>3</sub> (5 mM)	Alta intensidad de luz	<i>Neochloris oleabundans</i>	38	133	Li <i>et al.</i> , 2008
Peptona						
Fuente de carbono	Fotoheterotrófico	60 µE/m <sup>2</sup> .s y ácido acético	<i>Chlorella vulgaris</i>	50	78	Yeh, <i>et al.</i> , 2012
CO <sub>2</sub>	Mixotrófico presentó mejor P <sub>lip</sub>	Crecimiento fotoautotrófico Heterotrófico (glucosa)	<i>Chlorella vulgaris</i>	38 23	4 35	Liang <i>et al.</i> , 2009
NaHCO <sub>3</sub>		Mixotrófico (10 g/l glucosa)		21	54	
Glucosa		Foto, Mixo, Fotohetero y Heterotrófico	<i>Chlorella vulgaris</i>	58	144	Yeh y Chang, 2012
Glicerol		Fotoautotrófico - Heterotrófico	<i>Chlorella saccharophila</i>	18 - 54		Isieten <i>et al.</i> , 2012
Fructosa		Fotoautotrófico - Heterotrófico (glucosa)				
Sucrosa			<i>Chlorella sorokiniana</i>	13 - 23		Zheng <i>et al.</i> , 2012

Parámetro	Observaciones	Condiciones de cultivo	Especie microalgal	% Lípidos	P <sub>lip</sub> (mg/l.d)	Referencia	
Acetato de sodio Ácido acético	Maíz hidrolizado 5 % CO <sub>2</sub> incrementó % Lip	Heterotrófico	<i>Chlorella protothecoides</i>	55	932	Xu <i>et al.</i> , 2006	
		Mixotrófico (glicerol 1 %) Fotoautotrófico	<i>Chlorella protothecoides</i>	21,3 11,5 35,8		Sforza <i>et al.</i> , 2012	
		Fotoauto trófico (agotamiento N)	Fotoautotrófico - Heterotrófico (glucosa)	<i>Chlorella protothecoides</i>	15-55		Miao y Wu, 2004, 2006
		Fotoautotrófico - Heterotrófico (30 g/l glucosa)	Fotoautotrófico	<i>Chlorella zofingensis</i>	26 -51	35- 354	Liu <i>et al.</i> , 2011
		Fotoautotrófico (3000 lux)	Fotoautotrófico (3000 lux)	<i>Chlorella sp. marina</i>		12 - 10 - 37	Cheirsilp y Torpee, 2012
		Heterotrófico (2 g/l glucosa)	Heterotrófico (2 g/l glucosa)	<i>Chlorella sp. Agua dulce</i>		8 - 9 - 21	
		Mixotrófico (2 g/l glucosa, 3000 lux)	Mixotrófico (2 g/l glucosa, 3000 lux)	<i>Nannochloropsis sp.</i>		11- 9 - 31	
				<i>Chaetoceros sp.</i>		5 - 4 - 6	
		Heterotrófico medio optimizado	5,78 g/l glucosa, 9 g/l peptona, 4,48 g/l extracto levadura y 3,01 g/l extracto carne	<i>Tetraselmis suecica</i>	28 - 54	385 - 2582	Azma <i>et al.</i> , 2011
		Mejor 2 %	CO <sub>2</sub> (2 %, 5 %, 10 % y 15 %) semicontinuo	<i>Nannochloropsis oculata</i>	30 - 23	151 - 84	Chiu <i>et al.</i> , 2009
Mejor 2 %	CO <sub>2</sub> (2 %, 5 %, 10 % y 15 %) 1 FBR 6 FBR paralelo	<i>Chlorella sp.</i>	34 - 33 33 - 35	358 - 243 355 - 250	Chiu <i>et al.</i> , 2008 Chiu <i>et al.</i> , 2008		
CO <sub>2</sub>		1 etapa y 50 ml/min CO <sub>2</sub> 2 etapas y 50 ml/min CO <sub>2</sub>	<i>Chlorella vulgaris</i>	25 53	13 11	Wídjaja <i>et al.</i> , 2009	
		CO <sub>2</sub> (0,03 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %), para ambas cepas mejor 10 % CO <sub>2</sub>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	15 - 24 19	13 - 14 30	Tang <i>et al.</i> , 2011a	
	Baja concentración favorece Pl		<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	21 - 27 24	14 - 14 35	Tang <i>et al.</i> , 2011a	

Parámetro	Observaciones	Condiciones de cultivo	Especie microalgal	% Lípidos	P <sub>Lip</sub> (mg/l.d)	Referencia
Glucosa	Aumento en la concentración no afecta % Lip y favorece P <sub>Lip</sub>	Glucosa (0 - 20 g/l)	<i>Chlorella</i> sp. marina		12 - 65	Chersilp y Torpee, 2012
		Glucosa (0-20 g/l) 15 g/l	<i>Nannochloropsis</i> sp.		11 - 73	Chersilp y Torpee, 2012
		Glucosa ( 0 - 22,5 g/l) Mejor 15 g/l glucosa Aumento de 25 a 30 °C	<i>Scenedesmus obliquus</i>	9 - 7 10	6 - 32 59	Mandal y Mallick, 2009
Temperatura	Dismin. % Lip, P <sub>Lip</sub>	Aumento de 25 a 30 °C	<i>Chlorella vulgaris</i>	15 - 6	20 - 8	Converti <i>et al.</i> , 2009
	Aumentó % Lip	Disminución de 20 a 15 °C	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8 - 15	10 - 9	
		Aumento de 20 a 25° C	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8 - 14	10 - 10	
LUZ	Aumentó % Lip	90 - 300 E/m <sup>2</sup> .s con N (3,4 mM)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	16 - 35		Damiani <i>et al.</i> , 2010
	Mejor P <sub>Lip</sub> a 8000 lux	2000 - 10000 lux	<i>Chlorella</i> sp. marina		35 - 38 40	Chersilp y Torpee, 2012
	Mejor P <sub>Lip</sub> a 5000 lux		<i>Nannochloropsis</i> sp.		29 - 48 57	Chersilp y Torpee, 2012
	Con N	115 - 230 E/m <sup>2</sup> s y CO <sub>2</sub>	<i>Nannochloropsis</i> sp.	24 - 33	970-1450	Rodolff <i>et al.</i> , 2009
	Sola no influye	5 - 2100 E/m <sup>2</sup> s.	<i>Nannochloropsis gaditana</i>			Simionato <i>et al.</i> , 2011
	Con N mejor 40 g/l y 700 µE/m <sup>2</sup> .s	salinidad (13, 27 y 40 g/l) luz (170- 700 µE/m <sup>2</sup> .s)	<i>Nannochloropsis</i> sp.	35	413	Pal <i>et al.</i> , 2011
	Sin N mejor 13 g/l y 700 µE/m <sup>2</sup> .s			48	385	Pal <i>et al.</i> , 2011

Tabla 2. Contenido y productividad de lípidos de varias especies de microalgas, bajo diversas condiciones de cultivo.

### EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES

El nitrógeno ha sido demostrado como el principal regulador en el crecimiento y acumulación de lípidos (Rodolfi *et al.*, 2009; Yeh y Chang, 2012). Cuando un cultivo es expuesto a una intensidad luminosa adecuada, pero con limitación de nutrientes, se disminuye la tasa de división celular (aunque se sigue convirtiendo energía solar en energía química), pero a menor velocidad y como mecanismo de supervivencia, entonces se desvía el flujo de carbono fijado por la fotosíntesis a síntesis de lípidos o carbohidratos (Meng *et al.*, 2009; Pruvost *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). Dado que la disminución de nutrientes limita el crecimiento celular, al momento de seleccionar las condiciones de cultivo que favorezcan la acumulación de lípidos, es necesario maximizar su productividad volumétrica para cada cepa.

Las investigaciones realizadas para inducir la síntesis de lípidos a pequeña escala, concuerdan que bajo condiciones limitantes de nitrógeno se reduce el crecimiento, mientras que existe una gran variación en el contenido de lípidos y su perfil de ácidos grasos. Algunas especies del género *Chlorella* acumulan almidón en condiciones de deficiencia de nitrógeno, mientras que otras acumulan lípidos predominantemente neutros (Illman *et al.*, 2000). Las microalgas son capaces de crecer y sintetizar lípidos empleando diversas fuentes de nitrógeno, y se ha reportado al nitrato como la mejor fuente de nitrógeno para *Chlorella protothecoides* (Shen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010), *Dunaliella tertiolecta* (Chen *et al.*, 2011b) y *Neochloris oleoabundans* (Li *et al.*, 2008). Mientras que *Scenedesmus dimorphus* y *Scenedesmus rubescens* presentaron mayor afinidad por urea y amonio, respectivamente (Shen *et al.*, 2009; Lin y Lin, 2011) y en *Chlorella saccharophila* se observó mejor crecimiento con peptona como fuente de nitrógeno que con nitrato y amonio (Isleten *et al.*, 2012).

La disminución de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo bajo condiciones fotoautotróficas permitió que el contenido de lípidos alcanzara valores cercanos o superiores al 40 % en varias especies de *Chlorella* (Illman *et al.*, 2000; Widjaja *et al.*, 2009; Yeh y Chang, 2012), *Nannochloropsis* sp. (Rodolfi *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2011), *Nannochloris* sp. (Takagi *et al.*, 2000) y *Neochloris oleoabundans* (Pruvost *et al.*, 2009), y valores superiores al 20 % para *Tetraselmis suecica* (Rodolfi *et al.*, 2009), *Spirulina maxima* (Macedo y Alegre, 2001), y *Scenedesmus* sp. (Xin *et al.*, 2010a); en algunas especies asociada a una disminución de la productividad lipídica. Mientras que en otras especies como *Nannochloropsis* sp. en condiciones de alta temperatura en fotobiorreactores (FBRs) de 110 litros (Rodolfi *et al.*, 2009), *Chlorella vulgaris* (Converti *et al.*, 2009), *Nannochloris oculata* y *Chlorella* sp. (Hsieh y Wu, 2009; Praveenkumar *et al.*, 2012) además de un aumento en el contenido de lípidos, se observó un aumento en su productividad.

Por el contrario, Rodolfi *et al.* (2009) observaron que la disminución en el contenido de nitrógeno no afectó la acumulación de lípidos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Damiani *et al.*, 2010 reportaron para *Haematococcus pluvialis* una disminución en el contenido de lípidos al asociar bajas concentraciones de nitrógeno con una alta intensidad de luz. La limitación combinada de nutrientes (N, K, P) favoreció la acumulación de lípidos en *Chlorella* sp. (Praveenkumar *et al.*, 2012) y algunas especies del género *Scenedesmus*. Como se ha mencionado el género *Scenedesmus* en condiciones normales de cultivo posee un contenido de lípidos entre 9 % - 21 % (Mandal y Mallick, 2009; Xin *et al.*, 2010c; Arias *et al.*, 2011b; Lin *et al.*, 2012) y la limitación combinada de nitrato y fosfato estimuló su acumulación hasta un 53 % pero con bajas productividades de lípidos (Mandal y

Mallick, 2009; Xin *et al.*, 2010c; Tan y Lin, 2011). De igual forma se ha reportado que la adición de hierro al medio de cultivo promueve la acumulación de lípidos, como se observó en *Chlorella vulgaris* (Liu *et al.*, 2008) y *Scenedesmus rubescens* (Lin *et al.*, 2012).

#### EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO

Dependiendo del tipo de metabolismo utilizado por las microalgas para su crecimiento, la fuente de carbono puede ser orgánica (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, entre otras), o inorgánica (CO<sub>2</sub>). Fotoautotóricamente, las microalgas utilizan la luz como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis (Huang *et al.*, 2010); heterotóricamente, las microalgas en ausencia de luz utilizan solo compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, (Chojnacka y Marquez, 2004); mixotóricamente, utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de carbono y captan la energía de la luz y del carbono orgánico (Chen *et al.*, 2011a). La principal diferencia entre cultivos mixotóxicos y fotoheterotóxicos es que estos últimos requieren de luz para la incorporación del carbono orgánico. Por lo tanto, este tipo de cultivo necesita de luz y azúcares al mismo tiempo, la utilización de este tipo de cultivo para la producción de lípidos en microalgas es poco común.

Las microalgas fotoautótrofas pueden fijar CO<sub>2</sub> de tres fuentes diferentes: de la atmósfera, de los gases exhaustos de la industria o en forma de carbonatos solubles como Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub> (Wang *et al.*, 2008). La concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es de 0,03 - 0,06 % (0,36 mg/ml) y la mayoría de las microalgas pueden tolerar niveles más elevados de CO<sub>2</sub>, por lo general hasta 150 mg/ml, por lo que los gases de combustión de plantas de energía, que contienen hasta en 15 % de CO<sub>2</sub>, pueden ser alimentados al medio de cultivo de las microalgas (Brennan y Owende, 2010).

Las condiciones fotoautotóxicas han sido las más utilizadas para el cultivo de microalgas con fines de obtención de biodiesel y existe una gran variación en el contenido de lípidos obtenidos que va desde el 11 % al 63 %, dependiendo de la especie, generalmente asociado a la limitación de nitrógeno, adición de CO<sub>2</sub> e incremento de la intensidad luminosa, para aumentar el contenido de lípidos en la biomasa (Tabla 2).

Diversos autores evaluaron el efecto del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento y contenido celular de lípidos de microalgas, estos mostraron que la capacidad de asimilar CO<sub>2</sub> varía con la especie y en algunas microalgas (Chiu *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2009; Sforza *et al.*, 2012), altas concentraciones de CO<sub>2</sub> podrían inhibir el crecimiento celular, mientras que la adición de un 2 % al medio de cultivo de *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis oculata* (Chiu *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2009) y de un 5 % al de *Chlorella protothecoides* (Sforza *et al.*, 2012), en condiciones limitadas de nitrógeno, estimuló la productividad de los lípidos. De forma similar Tang *et al.*, 2011a, evaluaron la capacidad de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella pyrenoidosa* para fijar CO<sub>2</sub> y acumular lípidos en el intervalo de 0,03 % - 50 % de CO<sub>2</sub> y encontraron que las dos microalgas pueden crecer en todo el intervalo estudiado, pero la mayor productividad de biomasa se presentó a 5 % y 10 % de CO<sub>2</sub> para *S. obliquus* y *C. pyrenoidosa* respectivamente, además de que altos niveles de CO<sub>2</sub> (> 30 %) favorecieron la acumulación de lípidos.

Algunas especies de microalgas presentan mayor velocidad de crecimiento (Azma *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011) y productividad de lípidos (Xiong *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Azma *et al.*, 2011) en condiciones heterotóxicas. Entre las especies aptas

para el cultivo heterotrófico, *Chlorella* ha sido ampliamente estudiada, en especial *Chlorella protothecoides* ha mostrado a nivel laboratorio, en cultivos con glucosa y bajas concentraciones de nitrógeno, valores de lípidos 3,4 veces mayores que en condiciones fotoautotróficas (Miao y Wu, 2004; Miao y Wu, 2006) y valores de productividad de lípidos entre 654 mg/l.d y 3702 mg/l.d (Xu *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010). De igual forma, Liu *et al.*, 2011 reportaron que al cultivar células de *Chlorella zofingjensis* con 30 g/l de glucosa en la oscuridad, se obtuvo un rendimiento mayor de biomasa (411 %), lípidos totales (98 %) y una productividad de lípidos de 354 mg/l.d equivalente a 911 % comparado con células el cultivo fotoautotrófico, predominando los lípidos neutros, especialmente triglicéridos.

De igual forma Azma *et al.* (2011), en un cultivo de *Tetraselmis suecica* creciendo en condiciones heterotróficas con un medio de cultivo optimizado, reportaron una concentración celular de 28,88 g/l, tres veces superior a la obtenida en cultivo fotoautotrófico (8,40 g/l) y el contenido de lípidos se duplicó obteniendo una productividad de lípidos de 2582 mg/l.d .

Aun cuando el cultivo heterotrófico podría evitar los problemas asociados con la limitación de luz ocasionada por la alta densidad celular en fotobiorreactores grandes en cultivos fototróficos, pocas especies pueden crecer heterotróficamente, además de que este tipo de cultivo tiene varias limitaciones entre las que se pueden mencionar los problemas de contaminación en cultivos abiertos y el costo del sustrato; por esta razón algunos estudios se han centrado en la búsqueda de fuentes de carbono orgánico más económicas, como residuos orgánicos industriales o aguas residuales municipales. Xu *et al.* (2006), utilizaron polvo de maíz hidrolizado en lugar de glucosa para cultivar *Chlorella protothecoides*, lo que resultó en una alta producción de biomasa (2 g/l.d), un contenido de lípidos cuatro veces mayor que en condiciones fotoautotróficas (55,2 %) y una alta productividad de lípidos (932 mg/l.d).

El cultivo mixotrófico también ha mostrado ser una buena estrategia para aumentar la productividad de lípidos en algunas especies de *Chlorella* (Liang *et al.*, 2009; Cheirsilp y Torpee, 2012; Yeh y Chang, 2012) con el beneficio adicional de que se producen metabolitos fotosintéticos como  $\beta$ -caroteno, astaxantina y luteína. Liang *et al.*, 2009 evaluaron la productividad de lípidos de *Chlorella vulgaris* en condiciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas y encontraron que la velocidad de crecimiento en condiciones fotoautotróficas fue mucho menor comparada con el crecimiento heterotrófico y la mayor productividad de lípidos de  $54 \pm 2$  mg/l.d se obtuvo en condiciones mixotróficas con 1 % de glucosa y luz. Por otra parte, Yeh *et al.* (2012) evaluaron el crecimiento y contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* en cultivo fotoheterotrófico con diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol, acetato de sodio y ácido acético) encontrando que con ácido acético se obtuvo la mayor productividad de lípidos de 78 mg/l.d con un contenido de lípidos del 50 %.

Recientemente Zheng *et al.*, 2012 reportaron las ventajas de utilizar células heterótrofas como inóculo de un cultivo fotoautotrófico en estanques abiertos para la producción a gran escala de biomasa con alto contenido de lípidos de *Chlorella sorokiniana*; adicionalmente compararon el desempeño de cultivos fotoautotróficos y heterotróficos encontrando que la velocidad de crecimiento, la densidad celular y la productividad fueron hasta 7,4 veces mayor bajo condiciones heterotróficas.

## EFFECTO DE LA LUZ

Un aspecto importante a considerar en el cultivo de una especie microalgal, para la producción de biocombustibles, es sí la acumulación de lípidos se ve afectada por la exposición del cultivo a diferentes regímenes de luz; por lo que es necesario considerar su intensidad, su calidad espectral y la necesidad de establecer un fotoperiodo. La intensidad luminosa influye notablemente en la actividad fotosintética, el contenido de pigmentos y composición química de la microalga.

Cultivos de *Scenedesmus obliquus* fueron inhibidos a valores superiores a 297,5  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  y presentaron características similares, incluso en el perfil de ácidos grasos, a los cultivos heterótrofos, tendencia que se hizo más evidente al incrementar la cantidad de luz recibida (Gassan *et al.*, 2009); mientras que un aumento en la intensidad de 2000 a 8000 lux (39 - 156  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) favoreció el crecimiento de la microalga marina *Chlorella* sp., pero el incremento hasta 10000 lux (195  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) lo disminuyó ligeramente, no así para *Nannochloropsis* sp. que creció en forma continua en todo el rango de luz evaluado (39 - 195  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) mostrando una gran capacidad de aclimatación a la luz (Cheirsilp y Torpee, 2012). De igual forma, Simionato *et al.*, 2011 observaron tasas de crecimiento similares para *Nannochloropsis gaditana* en una amplia gama de irradiaciones y solo se observaron diferencias bajo condiciones extremas; los cultivos expuestos a intensidades de luz del orden de 5  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  crecieron lentamente mientras los cultivos sometidos a valores mayores de 1200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  alcanzaron la fase estacionaria rápidamente y el número de células al final fue inferior.

Con respecto al contenido de lípidos, algunos reportes evidencian que la capacidad de acumulación de lípidos se ve reforzada al aumentar la intensidad de luz en cultivos como en *Haematococcus pluvialis* (Damiani *et al.*, 2010) y *Nannochloropsis* sp. (Rodolfi *et al.*, 2009). En contraste, Cheirsilp y Torpee (2012) reportaron que mientras para obtener una alta concentración de biomasa de las microalgas marinas *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp., es necesario aumentar la intensidad de luz por encima de 117  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , intensidades de luz menores de este valor son más favorables para la acumulación de lípidos.

Estudios realizados por Simionato *et al.* (2011) con *Nannochloropsis gaditana*, revelaron que su acumulación ocurre durante la fase estacionaria y el grado de acumulación fue muy similar para todas las irradiaciones (5 - 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ), aunque a valores mayores de 1200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  la síntesis de lípidos se inició más temprano y en las células con una iluminación menor a 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  la acumulación de lípidos duró más tiempo; concluyendo que la intensidad de la luz por sí sola no parece inducir directamente la acumulación de lípidos, pero el exceso de iluminación puede aumentar el efecto de otros factores de estrés. Tal fenómeno también fue observado por Pal *et al.*, 2011 para *Nannochloropsis* sp., cuando el aumento de la intensidad de luz fue asociado a una alta salinidad y por Cheirsilp y Torpee (2012) para las microalgas marinas *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp. al conseguir doblar el contenido de lípidos cuando se cambió de cultivo en lote a lote alimentado, aumentando gradualmente la intensidad de luz.

## EFFECTO DE LA TEMPERATURA

Las variaciones de temperatura provocan cambios en la velocidad de crecimiento, en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos en la célula, además de que los efectos son específicos para cada especie. Algunas cepas marinas como *Nitzschia*

*closterium* e *Isochrysis* sp., tuvieron un crecimiento muy lento a 35 °C, mientras que cultivos de *Nitzschia closterium* no crecieron a temperaturas superiores a 30 °C o inferiores a 20 °C y *Nitzschia paleacea* resultó más tolerante a una temperatura de 10 °C (Renaud *et al.*, 1995). Estudios realizados por Converti *et al.*, 2009 mostraron que en cultivos de *Nannochloropsis oculata* al modificar la temperatura de 25 a 20 °C el contenido de lípidos disminuyó de 13,89 a 7,9 % pero al disminuir hasta 15 °C se incrementó nuevamente hasta 14,92 sin embargo como la tasa de crecimiento se vio afectada por los cambios de temperatura, la productividad de los lípidos no presentó variación, por el contrario el crecimiento de *Chlorella vulgaris* se vio afectado a temperaturas superiores a los 35 °C y una variación en la temperatura de 30 a 25 °C permitió un incremento en el contenido de lípidos de 5,9 a 14,7 % y como la tasa de crecimiento no se vio afectada a estas temperaturas, la productividad de los lípidos aumentó de 8 a 20 mg/l.d. Raghavan *et al.*, 2008 evaluaron el efecto de la temperatura, el nivel de CO<sub>2</sub> y la salinidad sobre el crecimiento y composición de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* y encontraron que el contenido de lípidos fue mayor a temperaturas entre 20 y 25 °C y que este no se afectó por la adición de CO<sub>2</sub> y que disminuyó al aumentar la salinidad.

#### **EFFECTO DE LOS FACTORES OPERACIONALES**

La agitación de los cultivos de microalgas es necesaria para evitar la sedimentación celular y para asegurar su exposición uniforme a la luz y a los nutrientes, además de que favorece el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el medio externo. Un mezclado inadecuado, reduce la productividad de biomasa y puede ocurrir muerte celular y fermentación del cultivo.

#### **EFFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO Y LA EDAD DEL CULTIVO**

Además de los factores discutidos anteriormente, la fase de crecimiento en que se encuentra el cultivo y su edad, afectan también el contenido y composición de los ácidos grasos de la biomasa. Generalmente el contenido de lípidos de las microalgas durante la fase exponencial de crecimiento es menor o igual a 15 % en base seca, porque estos compuestos solo se acumulan cuando las células están bajo condiciones de estrés fisiológico, lo cual generalmente está asociado a condiciones de limitación de nutrientes (Li *et al.*, 2008). En cultivos de *Nannochloropsis oculata* se encontró que la acumulación de lípidos al pasar de la fase logarítmica a la estacionaria aumentó significativamente del 30,8 % al 50,4 % (Chiu *et al.*, 2009).

Se ha observado que el contenido de lípidos es mayor en la fase estacionaria de crecimiento que en la fase exponencial. Bigogno *et al.*, 2002 determinaron en *Parietochloris incisa* un alto contenido de triacilgliceroles (43 % del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, el cual aumentó hasta 77 % en la fase estacionaria.

El tiempo de incubación del cultivo no solo afecta la acumulación de lípidos en la microalga, sino que también genera un cambio gradual en la composición de ellos. En un estudio realizado con *Chlorella vulgaris* se observó que un tiempo mayor de incubación previo a la transferencia de las células a un medio sin nitrógeno produjo un mayor contenido de lípidos y que un tiempo mayor de permanencia en el medio sin nitrógeno incrementó el contenido de lípidos, especialmente de triglicéridos, lo cual indica que es posible obtener una mayor productividad de lípidos variando no solo el tiempo de

incubación inicial en un medio de cultivo sin modificación sino también el tiempo en que la microalga permanece bajo condiciones de estrés (Widjaja *et al.*, 2009).

Estudios recientes sugieren un proceso para la producción de lípidos de dos etapas, en la primera las células se cultivan con suficientes nutrientes, seguido de su cultivo en condiciones limitadas de nutrientes (Rodolfi *et al.*, 2009; Widjaja *et al.*, 2009; Beal *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Praveenkumar *et al.*, 2012) o el uso de condiciones de estrés que incrementen el contenido específico de lípidos en cortos periodos de tiempo. Respecto a este último, diversos autores reportan que para el caso del género *Nannochloropsis* el incremento en la salinidad favorece la acumulación de lípidos en menos de 72 horas (Martinez *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2011), lo que en un proceso a gran escala podría considerarse como un cultivo continuo.

Al realizar un cálculo del rendimiento de la biomasa y de los lípidos para una microalga, podríamos considerar lo publicado por Torzillo *et al.*, 2010 para un cultivo de *Nannochloropsis* en condiciones a la intemperie, quienes hallaron una productividad superficial máxima de biomasa de 5,8 g/m<sup>2</sup>.d y un contenido de lípidos de 43,4 % reportado por Martinez *et al.*, 2011 en condiciones de estrés por salinidad. Considerando 300 días de operación de planta se obtiene un rendimiento de biomasa de 17,4 t/ha.a y un rendimiento de aceite de 7,55 t/ha.a. Si los datos anteriores se comparan con el rendimiento de aceite alcanzado por el cultivo de palma (*Elaeis guineensis*) de 3,5 t/ha.a (Bourgis *et al.*, 2011) se demuestra teóricamente que con el empleo de las microalgas se podría producir la misma cantidad de aceite empleando tan solo el 50 % del terreno necesario para hacerlo a partir de palma aceitera, además de que podría ser un terreno no apto para la agricultura.

#### VARIACIÓN DEL PERFIL LÍPIDICO CON LAS CONDICIONES DE CULTIVO

Debido a que las propiedades del biodiesel se ven influidas por la calidad de los lípidos a partir de los cuales se ha producido, para obtener biodiesel de calidad es necesario asegurarse que los lípidos contengan ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación (preferentemente los ácidos palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0) que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetano, estabilidad oxidativa) sin comprometer sus características de flujo (punto de nube), viscosidad y lubricidad (Knothe, 2005; Chisti, 2007; Knothe, 2008; Schenk *et al.*, 2008). La norma EN 14214 limita el contenido de ácido linolénico (C18:3) y de los ácidos poliinsaturados con cuatro enlaces dobles o más, a 12 % y 1 % respectivamente.

Los cultivos limitados en nitrógeno mostraron una tendencia generalizada a incrementar el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y disminuir los poliinsaturados, mientras que al aumentar la concentración de este nutriente, se observa un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados. Así, *Nannochloropsis* sp. en un medio limitado en nitrógeno después de cinco días presentó un incremento en los ácidos grasos mirístico (de 0,7 % a 2,9 %), palmítico (de 4,8 % a 19,8 %), palmitoleico (de 3,9 % a 15,1 %) y oleico (de 0,7 % a 6,8 %) (Rodolfi *et al.*, 2009) y al evaluar el efecto de la salinidad, la intensidad de luz y la disponibilidad de nitrógeno Pal *et al.*, 2011, evidenciaron para la misma microalga la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico en condiciones limitadas de nitrógeno sin importar el grado de luz o salinidad y en condiciones

ricas en nitrógeno asociadas a alta intensidad de luz y salinidad; con una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico).

Para *Chlorella vulgaris*, Yeh y Chang (2012) observaron que bajo condiciones fotoautotróficas y fotoheterotróficas, la disminución del nitrógeno en el medio de cultivo tiene un importante papel en la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico y la disminución los ácidos grasos poliinsaturados. En condiciones mixotróficas *Chlorella vulgaris* presentó un perfil de lípidos compuesto principalmente por ácido palmítico y ácido oleico (50 % - 62 %) independientemente de la concentración de nitrógeno en el medio. Para *Scenedesmus rubescens* la limitación de nutrientes al aumentar el tiempo de cultivo, claramente evidenció un aumento en el ácido oleico (de 16 % a 54 %) y la disminución en los ácidos linoleico y linolénico (Tan y Lin, 2011). Resultados similares fueron reportados por Arias y Cañizares (2011) y Arias *et al.*, 2011a, para *Scenedesmus incrasatulus* al observar un aumento del 78,8 % en el contenido de ácido palmítico y de 133,4 % de ácido oleico al pasar de 6 a 11 días de cultivo.

Para *Nannochloropsis* sp. se evidenció un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexaenoico) al aumentar la concentración de nitrato y fosfato en el medio (Hu y Gao, 2006), mientras el contenido de ácido eicosapentanoico se incrementó en un medio rico solo en nitrógeno (Xu *et al.*, 2004).

En otros trabajos se estudió el efecto combinado de la fuente de carbono (bicarbonato o acetato) y los niveles de radiación en el crecimiento y perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Pavlova lutheri* y se encontró que el crecimiento y la composición lipídica fueron más sensibles a las variaciones en la intensidad de luz que a la fuente de carbono; a una intensidad de luz de 20  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  el porcentaje de los ácidos grasos saturados fue de 25,8 % y 23,9 % con bicarbonato y acetato respectivamente y al aumentar la intensidad de luz a 340  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  los ácidos grasos saturados alcanzaron un valor de 29 % en el medio con bicarbonato y de 29,7 % el medio con acetato (Guihéneuf *et al.*, 2009). Así mismo, en un cultivo de *Nannochloropsis* sp. un aumento de la intensidad de luz produjo un incremento en la productividad de la biomasa y el contenido de ácidos grasos, especialmente saturados (mirístico y palmítico) y monoinsaturados (palmítico y oleico) (Rodolfi *et al.*, 2009).

El fósforo ha presentado un efecto similar al nitrógeno. Al inicio de un cultivo de *Nannochloropsis* sp. se presentaron principalmente lípidos polares y esteroides y la disminución de la concentración de fósforo en el medio de cultivo provocó un aumento en el contenido lipídico de 13,2 % a 50,1 % de los cuales el 67 % fueron triglicéridos, sin embargo no se presentó un efecto benéfico en la productividad de lípidos debido al bajo crecimiento celular (Rodolfi *et al.*, 2009). Resultados similares fueron encontrados al crecer *Monodus subterraneus* en diferentes concentraciones de fosfato, donde al disminuir su concentración en el medio de cultivo se incrementó el porcentaje de lípidos totales, principalmente triglicéridos (Khozin y Cohen, 2006).

El efecto de la adición de  $\text{CO}_2$  al medio de cultivo presenta variabilidad en las microalgas, por ejemplo, para la marina *Nannochloropsis* sp., la adición de 2 % de  $\text{CO}_2$  estimuló la acumulación de EPA (20:5n-3) (Hoshida *et al.*, 2005), para *Chlorella vulgaris*, se ha reportado que la disminución del contenido de  $\text{CO}_2$  en el medio de cultivo (de 2 % a 0,04 %) favorece la producción de ácidos grasos con mayor grado de insaturación como el ácido  $\alpha$ -linolénico (Tsuzuki *et al.*, 1990). Para *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella pyrenoidosa*, Tang *et al.*,

2011a, reportaron que independientemente del nivel de CO<sub>2</sub> los ácidos grasos mayoritarios son de 16 y 18 carbonos y altos niveles de CO<sub>2</sub> (30 - 50 %) favorecieron la producción ácido linolénico. El perfil lipídico de *Scenedesmus obliquus* en medio rico en nutrientes con 10 % CO<sub>2</sub> está compuesto por 67 % de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos y la eliminación de los nutrientes del medio de cultivo favoreció su acumulación alcanzando cerca del 90 % del total de ácidos grasos con 31 % de ácido oleico después de seis días de cultivo bajo condiciones deficientes de nutrientes (Ho *et al.*, 2010). Para *Chlorella protothecoides* Xiong *et al.*, 2008 reportaron los ácidos palmítico, oleico y linoleico como los componentes principales del aceite microalgal, representando 80 % del contenido total de FAME. Generalmente, una baja intensidad luminosa induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), los cuales están funcional y estructuralmente asociados a la membrana celular. En contraste, las altas intensidades luminosas disminuyen el contenido de lípidos polares y estimulan la producción de lípidos de reserva, principalmente triglicéridos (Solovchenko *et al.*, 2008).

Con respecto a la temperatura se ha observado una relación inversa entre el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Renaud *et al.*, 1995; Jiang y Chen, 2000; Renaud *et al.*, 2002) debido a que la célula necesita mayor cantidad de PUFA para mantener la fluidez de la membrana celular o a que las bajas temperaturas conducen a un alto nivel de oxígeno molecular intracelular, lo cual mejora la actividad de las enzimas desaturasa y elongasa que participan en la biosíntesis de PUFA (Jiang y Chen, 2000). Renaud *et al.*, 1995 y Renaud *et al.*, 2002 en sus investigaciones con *Isochrysis sp.*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, y cuatro especies de microalgas australianas *Isochrysis sp.*, *Rhodomonas sp.*, *Cryptomonas sp.* y *Chaetoceros sp.* encontraron altos niveles de PUFA a las temperaturas de crecimiento más bajas.

## CONCLUSIÓN

A la luz de las investigaciones realizadas en las últimas dos décadas, el interés en el cultivo de microalgas como fuente potencial de lípidos para la producción de biodiesel de tercera generación es global, tanto en los países desarrollados como en los de economías emergentes. En el ambiente de laboratorio las microalgas han mostrado potencial debido a su alto contenido y productividad de lípidos, por lo que su rendimiento de aceite es mayor comparado con el de las plantas oleaginosas. Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores que se han obtenido, para producir comercialmente el biodiesel a partir de microalgas, es necesaria más investigación para la producción masiva de las especies identificadas como potenciales, por su alta productividad de lípidos y su adecuado perfil de ácidos grasos.

Debido a la gran variabilidad de las respuestas que presenta cada especie a determinadas condiciones de cultivo, no existe una cepa ideal, sin embargo las más estudiadas y con potencial reconocido pertenecen a los géneros *Chlorella*, por su facilidad para crecer bajo condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas, en especial por su capacidad de desarrollarse en oscuridad total consumiendo una fuente orgánica de carbono, alcanzando altas productividades de lípidos; *Scenedesmus*, por su perfil lipídico rico en ácidos grasos saturados y monoinsaturados, su capacidad para utilizar los nutrientes presentes en las aguas residuales y su tolerancia a concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub>;

*Nannochloropsis*, por su capacidad de adaptación a altas intensidades de luz y su acumulación de lípidos en periodos breves de tiempo, en condiciones de alta salinidad; *Nannochloris*, *Dunaliella* y *Tetraselmis* por su alto contenido de lípidos y su tolerancia a altas concentraciones de salinidad; *Neochloris*, por su alto contenido de lípidos en condiciones de alta intensidad de luz.

Debido a la gran variación de la productividad y del perfil lipídico de las microalgas en función de las condiciones de cultivo, sería conveniente mezclar aceites producidos por diversos géneros de microalgas, para asegurar el cumplimiento de las normas internacionales de calidad establecidas para el biodiesel.

Finalmente, independientemente de la especie seleccionada para obtener lípidos que eventualmente puedan ser convertidos a biodiesel, el objetivo final es desarrollar un proceso rentable y económico para estar en posibilidades de competir con los combustibles fósiles. Debido a esto, se ha sugerido establecer un proceso que permita la producción de biodiesel y el aprovechamiento de otros coproductos obtenidos tanto a partir de la biomasa como del proceso de transesterificación.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CINVESTAV - IPN por el soporte técnico para el desarrollo de esta revisión y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT-México, por las becas otorgadas a Martha Arias Peñaranda y Alfredo de Jesús Martínez Roldán para realizar el Doctorado en Ciencias, especialidad Biotecnología en el CINVESTAV - IPN.

#### BIBLIOGRAFÍA

AMIN S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energ Convers Manage.* 2009;50(7):1834-1840.

ARIAS MT, CAÑIZARES VILLANUEVA RO. Evaluación de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* como posible fuente de lípidos para la obtención de biodiesel. En XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Queretaro, México. 2011. Disponible en: URL:<http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/IX/carteles/CIX-20.pdf>

ARIAS MT, CRISTIANI E, MONTES MC, CAÑIZARES RO. Efecto de la edad del cultivo sobre el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus incrassatulus* y su influencia en la producción de biodiesel de calidad. *Bol Soc Argent Bot.* 2011a;46(supl.2):34.

ARIAS MT, CRISTIANI E, TORZILLO G, ESPARZA F, CAÑIZARES RO. Comparación de métodos para la extracción de lípidos totales en la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. *Bol Soc Argent Bot.* 2011b;46(supl.2):34-35.

AVAGYAN AB. A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles. *Clean Techn Environ Policy.* 2008;10(4):313-317.

AZMA M, MOHAMED MS, MOHAMAD R, RAHIM RA, ARIFF AB. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochem Eng J.* 2011;53(2):187-195.

BEAL CM, WEBBER ME, RUOFF RS, HEBNER RE. Lipid Analysis of *Neochloris oleoabundans* by Liquid State NMR, Biotechnol and Bioeng. 2010;106(4):573-583.

BIGOGNO C, KHOZIN-GOLDBERG I, BOUSSIBA S, VONSHAK A, COHEN Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. Phytochemistry. 2002;60(5):497-503.

BOURGIS F, KILARU A, CAO X, NGANDO-EBONGUE GF, DRIRA N, OHLROGGE JB, *et al.* Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. P Natl Acad Sci USA. 2011;108(44):18186-18186.

BRENNAN L, OWENDE P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, Renew Sust Energ Rev. 2010;14(2):557-577.

CASTILLO LE, MARTÍNEZ AJ, ARIAS MT, CAÑIZARES RO. Identificación de los parámetros de cultivo con mayor influencia en la productividad de lípidos en *Scenedesmus incrassatulus* mediante el uso del diseño de Plackett y Burmann. Bol Soc Argent Bot. 2011;46(supl.2):37.

CHEIRSILP B, TORPEE S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. Bioresour Technol. 2012;110:510-516.

CHEN CY, YEY KL, AISYAH R, LEE DJ, CHANG JS. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresour Technol. 2011a;102(1):71-81.

CHEN M, TANG H, MA H, HOLLAND TC, NG S. K.Y, SALLEY S. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresour Technol. 2011b;102(2):1649-1655.

CHINNASAMY S, BHATNAGAR A, HUNT RW, DAS KC. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. Bioresour Technol. 2010;101(9):3097-3105.

CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. 2007;25:294-306.

CHIU SY, KAO CY, CHEN CH, KUAN TC, ONG SC, LIN CS. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. Bioresour Technol. 2008;99(9):3389-3396.

CHIU SY, KAO CY, TSAI MT, ONG SC, CHEN CH, LIN CS. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. Bioresour Technol. 2009;100(2):833-838.

CHOJNACKA K, MARQUEZ ROCHA FJ. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnol. 2004;3(1):21-34.

CONVERTI A, CASAZZA A, ORTIZ E, PEREGO P, BORGHI M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem Eng Process. 2009;48(6):1146-1151.

DAMIANI MC, POPOVICH CA, CONSTENLA D, LEONARDI P. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. Bioresour Technol. 2010;101(11):3801-3807.

DEMIRBAS A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic

supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey, *Energy Convers Manage.* 2003;44(13):2093-2109.

DEMIRBAS A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers Manage.* 2009;50(1):14-34.

GASSAN HG, MARTINEZ M, SANCHEZ S. Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. *J Chem Technol Biotechnol.* 2009;84(10):1550-1558.

Global Data, Global Biodiesel Market Analysis and Forecasts to 2020. Accessed May 26, 2012 en <http://www.markt-studie.de/168/d/2010/03/30/globaldata-global-biodiesel-market-analysis-and-forecasts-to-2020/>.

GUIHÉNEUF F, MIMOUN V, ULMANN L, TREMBLIN G. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2009; 369(2):136-143.

HALEK F, KAVOUSI A, BANIFATEMI M. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines. *World Academy of Science Eng Technol.* 2009;57:460-462.

HERNÁNDEZ-REYES E, MARTÍNEZ-ROLDÁN AJ, CAÑIZARES VILLANUEVA RO. Contenido de lípidos de dos especies diferentes del género *Scenedesmus* para la eventual producción de bioenergéticos. En: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. 2009. Disponible en: URL:[http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA\\_IX/CIX-11.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_IX/CIX-11.pdf)

HO SH, CHEN WM, CHANG JS. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresour Technol.* 2010;101(22):8725-8730.

HOSHIDA H, OHIRA T, MINEMATSU A, AKADA R, NISHIZAWA Y. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *J Appl Phycol.* 2005;17(1):29-34.

HSIEH C, WU W. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour Technol.* 2009;100(17):3921-3926.

HU H, GAO K. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration, *Biotechnol Lett.* 2006;28(13):987-992.

HU Q, SOMMERFELD M, JARCIS E, GHIRARDI M, POSEWITZ M, SEIBERT M, *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J.* 2008;54(4):621-639.

HUANG GH, CHEN F, WEI D, ZHANG X, CHEN G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy.* 2010;87(1):38-46.

ILLMAN AM, SCRAGG AH, SHALES SW. Increase in *Chlorella strains* calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol.* 2000;27(8):631-635.

IMAHARA H, MINAMI E, SAKA S. Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. *Fuel.* 2006;85(12-13):1666-1670.

ISLETEN-HOSOGLU M, GULTEPE I, ELIBOL M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem Eng J.* 2012;61:11-19.

JIANG Y, CHEN F. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. J Am Oil Chem Soc. 2000;77(6):613-617.

KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. Phytochemistry. 2006;67(7):696-701.

KIM MK, PARK JW, PARK CS, KIM SJ, JEUNE KH, CHANG MU, *et al.* Enhanced production of *Scenedesmus* spp. green microalgae using a new medium containing fermented swine wastewater. Bioresour Technol. 2007;98(11):2220-2228.

KNOTHE G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Process. Technol, 2005;86(10):1059-1070.

KNOTHE G. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. Energy Fuels. 2008;22(2):1358-1364.

LARDON L, HELIAS A, SIALVE B, STEYER J, BERNARD O. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. Environ Sci Technol. 2009;43(17):6475-6481.

LIX, XU H, WU Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. Biotechnol Bioeng. 2007;98(4):764-771.

LI Y, HORSMAN M, WANG B, WU N, LAN C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;81(4):629-636.

LIANG Y, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnol Lett. 2009;31(7):1043-1049.

LIM S, TEONG LK. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview. Renew Sust Energ Rev. 2010;14(3):938-954.

LIN Q, GU N, LIN J. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. Bioresour Technol. 2012;112:242-247.

LIN Q, LIN, J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. Bioresour Technol. 2011;102(2):1615-1621.

LIU J, HUANG J, SUN Z, ZHONG Y, JIANG Y, CHEN F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. Bioresour Technol. 2011;102(1):106-110.

LIU ZY, WANG GC, ZHOU BC. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol. 2008;99(11):4717-4722.

MACEDO R, ALEGRE R. Influencia do teor de nitrogenio no cultivo de Spirulina máxima em dois níveis de temperatura-Parte II: Producao de lipídios. Ciencia Tecnol Aliment. 2001;21(2):183-186.

MANDAL S, MALLICK N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. Appl Microbiol Biotechnol, 2009;84:281-291.

MARTÍNEZ ROLDÁN AJ, PONCE-NOYOLA MT, ESPARZA GARCÍA F, CRISTIANI URBINA E, TORZILLO G, CAÑIZARES VILLANUEVA RO. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento, consumo de nutrientes y contenido específico de lípidos en *Nannochloropsis* sp. Bol Soc Argent Bot. 2011;46(Supl.2):43-44.

MATA TM, MARTINS AA, CAETANO NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renew Sust Energ Rev. 2010;14(1):217-232.

MENG X, YANG J, XU X, ZHANG L, NIE Q, XIAN M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energ*. 2009;34(1):1-5.

MIAO X, WU Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J Biotechnol*. 2004;110(1):85-93.

MIAO X, WU Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol*. 2006;97(6):841-846.

MOAZAMI N, ASHORI A, RANJBAR R, TANGESTANI M, EGHTESEADI R, NEJAD AS. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenergy*. 2012; 39:449-453.

NAGLE N, LEMKE P. Production of methyl fuel from microalgae. *Appl Biochem Biotechnol*. 1990;4(1):355-361.

PACKER M. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy*. 2009;37(9):3428-3437.

PAL D, KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z, BOUSSIBA S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(4):1429-1441.

POPOVICH CA, DAMIANI C, CONSTENLA D, MARTÍNEZ AM, FREIJE H, GIOVANARDI M, *et al.* *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresour Technol*. 2012;114:287-293.

POSTEN C, SCHAUB G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels - A process view. *J Biotechnol*. 2009;142(1):64-69.

PRAVEENKUMAR R, SHAMEERA K, MAHALAKSHMI G, AKBARSHA MA, THAJUDDIN N. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass Bioenergy*. 2012;37:60-66.

PRUVOST J, VAN VOOREN G, COGNE G, LEGRAND J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour Technol*. 2009;100(23):5988-5995.

RAGHAVAN G, HARIDEVI CK, GOPINATHAN CP. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research*. 2008;39(10):1053-1058.

RAMOS MJ, FERNÁNDEZ CM, CASAS A, RODRÍGUEZ L, PÉREZ A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol*. 2009;100(1):261-268.

RENAUD SM, LUONG-VAN T, LAMBRINIDIS G, PARRY DL. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 2002;211(1-4):195-214.

RENAUD SM, ZHOU HC, PARRY DL, LOUNG-VAN T, WOO KC. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp. *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. *J Appl Phycol*. 1995;7(6):595-602.

RODOLFI L, CHINI G, BASSI N, PADOVANI G, BIONDI N, BONINI G, *et al.* Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(1):100-112.

ROSILLO-CALLE F. Biomass Energy -An Overview Landolf-Bornstein Group VIII. Advanced Materials and Technologies, Springer. 2006;3C:334-373.

SANTOS AM, JANSSEN M, LAMERS PP, EVER WAC, WIJFFELS RH. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. Bioresour Technol. 2012;104:593-599.

SCHENK PM, THOMAS-HALL SR, STEPHENS E, MARX UC, MUSSGNUG JH, POSTEN C, *et al.* Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy Res. 2008;1(1):20-43.

SFORZA E, CIPRIANI R, MOROSINOTTO T, BERTUCCO A, GIACOMETTI G. Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. Bioresour Technol. 2012;104:523-529.

SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, ROESSLER P. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA. 1998;81-253.

SHEN Y, PEI Z, YUAN W, MAO E. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. Int J Agric Biol Eng. 2009;2(1):51-57.

SHEN Y, YUAN W, PEI Z, MAO E. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. Appl Biochem Biotechnol. 2010;160(6):1674-1684.

SIMIONATO D, SFORZA H, CARPINELLI E, BERTUCCO A, GIACOMETTI G, MOROSINOTTO T. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. Bioresour Technol. 2011;102(10):6026-6032.

SINGH J, GU S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renew Sust Ener Rev. 2010;14(9):2596-2610.

SOLOVCHENKO AE, KHOZIN-GOLDBERG I, DIDI-COHEN S, COHEN Z, MERZLYAK MN. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. J Appl Phycol. 2008;20(3):245-251.

SYDNEY EB, STURM W, DE CARVALHO JC, THOMAZ-SOCCOL V, LARROCHE C, PANDEY A, *et al.* Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresour Technol. 2010;101(15):5892-5896.

TAKAGI M, WATANABE K, YAMABERI K, YOSHIDA T. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;54(1):112-117.

TAN Y, LIN J. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. Bioresour Technol. 2011;102(21):10131-10135.

TANG D, HAN W, LI P, MIAO X, ZHONG J. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. Bioresour Technol. 2011a;102(3):3071-3076.

TANG H, ABUNASSER N, GARCIA MED, CHEN M, SIMON KY, STEVEN KG, *et al.* Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. Appl Energy. 2011b;88(10):3324-3330.

TORZILLO G, GIANNELLI L, MARTINEZ ROLDAN AJ, VERDONE N, DE FILIPPIS P, SCARSELLA M, *et al.* Microalgae culturing in thin-layer photobioreactors. Chem Eng Trans. 2010;20(45):265-270.

TSUZUKI M, OHNUMA E, SATO N, TAKAKU T, KAWAGUCHI A. Effects of CO<sub>2</sub> Concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiol.* 1990;93(3):851-856.

VYAS AP, VERMA JL, SUBRAHMANYAM N. A review on FAME production processes. *Fuel.* 2010;89(1):1-9.

WANG B, LI Y, WU N, LAN C. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79(5):707-718.

WIDJAJA A, HIEN C, JU Y. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2009;40(1):13-20.

XIN L, HONG-YING H, JIA Y. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnol.* 2010a;27(1):59-63.

XIN L, HONG-YING H, KE G, JIA Y. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecol Eng.* 2010b;36(4):379-381.

XIN L, HONG-YING H, KE G, YING-XUE S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol.* 2010c;101(14):5494-54500.

XIONG W, LI X, XIANG J, WU Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78(1):29-36.

XU F, CAI Z, CONG W, OUYANG F. Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed - batch culture. *Biotechnol Lett.* 2004;26(17):1319-1322.

XU H, MIAO X, WU Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol.* 2006;126(4):499-507.

XUE F, ZHANG X, LUO H, TAN T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem.* 2006;41(7):1699-1702.

YEH K-L, CHANG J-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresour Technol.* 2012;105:120-127.

YEH KL, CHEN CY, CHANG JS. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochem Eng J.* 2012;64:1-7.

ZAMALLOA C, BOON N, VERSTRAETE W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl Energy.* 2012;92:733-738.

ZHENG Y, CHI Z, LUCKER B, CHEN S. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresour Technol.* 2012;103(1):484-488.