

Revisión crítica

Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades

Maribel M. Loera-Quezada y Eugenia J. Olguín*

Red de Manejo Biotecnológico de Recursos. Instituto de Ecología, A.C. (INECOL) Km. 2.5 Carretera Antigua a Coatepec No. 351, Congregación El Haya. Xalapa, Veracruz 91070, México.

*Autor de correspondencia: eugenia.olguin@inecol.edu.mx

Resumen

La presente revisión proporciona información actualizada con relación a los principales retos científico-tecnológicos que se deben enfrentar y resolver para lograr producir biodiesel a partir de microalgas a un costo competitivo. Se discute el entorno ambiental que ha generado la necesidad de este tipo de producto, haciendo énfasis en el cambio climático, los gases efecto invernadero (GEI) y la producción de Bioenergéticos. Se detallan las ventajas que ofrece la producción de biodiesel a partir de microalgas, tales como: a) Las microalgas tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional; b) Sólo este bioenergético tiene una verdadera huella ecológica pequeña; c) En contraste con otros bioenergéticos, se requiere una superficie muy pequeña para cubrir la demanda actual de diesel de petróleo; d) Las microalgas oleaginosas pueden ser cultivadas en agua de mar, en agua salobre o en aguas residuales, disminuyendo así la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimentos; e) Las microalgas son excelentes captadoras de CO₂; f) Con relación a la emisión de gases invernadero, es de los bioenergéticos que muestran un valor negativo. Sin embargo, la tecnología para la producción de biodiesel a partir de microalgas, aún enfrenta grandes retos para lograr una producción a escala comercial y de manera rentable. Entre los más importantes destacan: a) selección de cepas con mayores productividades de biomasa y de lípidos, mejores perfiles de lípidos y mejor adaptabilidad a condiciones de cultivo a gran escala, b) estrategias de cultivo muy efectivas para lograr el máximo posible de productividad de lípidos y de biomasa al menor costo. Entre dichas estrategias, destacan el uso de condiciones de estrés fisiológico y el uso de aguas residuales para reemplazar agua destinada al uso agrícola; c) selección del tipo de reactor o de una combinación de ellos para lograr máxima producción de biomasa al mínimo costo y d) optimización de los métodos actualmente disponibles para extracción de lípidos y transesterificación de ácidos grasos para disminuir sus altos costos e impactos ambientales negativos. Se concluye que existen diversas oportunidades en cada uno de los retos a vencer y que se deben combinar el conocimiento científico más avanzado con las actividades y capacidades empresariales que están emergiendo en busca de procesos competitivos. Las ventajas de este bioenergético de segunda generación y el escenario actual de precios del petróleo al alza, sugieren proyecciones optimistas para lograr avances en el corto y mediano plazo que permitan producirlo a un costo competitivo.

Palabras clave: *bioenergéticos, cambio climático, microalgas oleaginosas, lípidos, triacilglicéridos, fotobioreactores, lagunas abiertas.*

Abstract

This review provides current information regarding the scientific and technological challenges to be addressed and solved in order to enhance the cost-effectiveness of the integral process for producing biodiesel from microalgae. Global warming, greenhouse gases and production of bioenergy are discussed primarily to provide a general framework. Several advantages of microalgae compared to other sources of biodiesel are also discussed: a) microalgae produce a significantly higher yield of lipids, compared to conventional crops for biodiesel production; b) this bioenergy source shows the smallest ecological print; c) a smaller territorial surface is required for fulfilling the current diesel from petrol demand, compared to the land surface required by other bioenergy sources; d) microalgae can be cultivated either in sea water, brackish water or wastewater, avoiding the pressure of the use of fresh water for food production; e) microalgae perform excellent at CO₂ capture; f) biodiesel from microalgae shows a negative release of greenhouse gases. However, despite all the advantages shown by microalgae to produce biodiesel, there are still several scientific and technological challenges to solve before large scale production at competitive cost can be accomplished. Among the more important are: a) selection of the best performing strains, concerning the highest biomass productivity and highest oil yield, the best lipid profile and the best adaptability to large scale production; b) to design very effective culture strategies to achieve high biomass and lipid productivity at a competitive cost. Among the most important culture strategies, research on induction of higher lipid content by physiological stress and successful cultivation in wastewater, is still full of opportunities; d) selection of the best performing reactor design or a combination of various types, in order to accomplish the highest biomass and lipid productivity at a minimum cost and e) optimization of currently available processes for lipid extraction and transesterification of fatty acids to decrease their high costs and negative environmental impacts. It is concluded that there are several opportunities in each of the challenges to confront and a combination of scientific knowledge and entrepreneur skills are required for the design of competitive processes. The several advantages that this second generation bioenergy source possess and the international scenario of fossil oil prices rising once again, suggest optimistic projections for achieving production of biodiesel from microalgae at competitive prices in the medium and long term.

Keywords: *Bioenergy sources, global warming, oleaginous microalgae, lipids, triacylglycerides, photobioreactors, raceways, open ponds.*

1. Introducción

Indudablemente, el cambio climático es uno de los grandes desafíos del siglo XXI ya que sus impactos son globales y cada vez más severos, afectando la estabilidad económica y social del planeta, además de la ambiental. Entre los efectos más graves destacan los aumentos observados del promedio mundial de la temperatura del aire y del océano, el deshielo generalizado de glaciares, las modificaciones en los patrones de preci-

pitación, los cambios en la intensidad o frecuencia de eventos climáticos extremos y el aumento del promedio mundial del nivel del mar, entre otros. Desde hace décadas, se conoce la estrecha relación entre el aumento continuo de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y el cambio global (IPCC, 2007).

Como respuesta a esta problemática del cambio global en los últimos años, las políticas ambientales han favorecido un incremento en el uso de biocombustibles a

nivel mundial, principalmente para sustituir los combustibles fósiles utilizados en el transporte vehicular. Estos nuevos desarrollos tecnológicos, están recibiendo atención y apoyo debido tanto a la preocupación por la disminución de las reservas mundiales del petróleo, así como a un esfuerzo para mitigar las emisiones de los GEI. La tendencia mundial es reducir al máximo el uso de combustibles fósiles y reemplazarlos con biocombustibles que sean renovables, no contaminantes y carbono neutrales. Actualmente, los biocombustibles en los que se ha invertido más esfuerzo son el etanol a partir de caña de azúcar y del maíz y el biodiesel a partir de aceite de soya, canola, girasol, palma de aceite. Sin embargo, la sustentabilidad de la producción de estos biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada, principalmente porque la gran demanda de ellos requiere la conversión del uso del bosques o áreas naturales en superficies agrícolas o incluso el uso de superficies actualmente utilizadas para producción de alimentos (Majer *et al.*, 2009).

Para lograr una sustentabilidad económica y ambiental, se requiere que el proceso de producción de biocombustibles no sólo sea renovable, sino que también contribuya al secuestro de CO₂ atmosférico (Schenk *et al.*, 2008). Las microalgas oleaginosas, consideradas como fuente de biocombustibles de segunda generación, contribuyen de manera importante a la fijación de CO₂ y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles, tales como el biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno, además de que producen metabolitos secundarios con aplicación en la industria farmacéutica, para complementos nutricionales, acuicultura, cosmetología. (Rosenberg, *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008).

Considerando que una de las limitaciones actuales en la producción masiva de microalgas es todavía el alto costo de producción, su cultivo para la producción de biodiesel utilizando a las aguas residuales como fuente de nutrientes, es una alternativa bastante promisoría y ambientalmente sustentable. Existe amplia experiencia en el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, ya que son eficaces en la remoción de nutrientes, materia orgánica, metales pesados y de xenobióticos, entre otros (Hernández y Olguín, 2002; Olguín, 2003; Muñoz y Guieysse, 2006). Sin embargo, existen muy pocos reportes con relación al uso de agua residual para el cultivo de microalgas oleaginosas y la producción simultánea de biodiesel.

Otra limitación importante en este tipo de desarrollo, es que aunque muchas especies de microalgas son capaces de producir grandes cantidades de lípidos, con frecuencia las concentraciones altas de lípidos se obtienen cuando las algas son sometidas a condiciones de estrés impuestas por estímulos físicos y/o químicos (Hu *et al.*, 2008), lo que con frecuencia está asociado a condiciones de limitación de nutrientes y por lo tanto, a baja productividad de biomasa y de lípidos.

Por lo anterior, algunos de los mayores retos en el desarrollo de procesos para la producción de biodiesel con microalgas, consisten en seleccionar las mejores cepas y establecer estrategias de cultivo para que se logre el máximo posible de productividad de biomasa y de lípidos, a pesar de las condiciones de estrés fisiológico. Asimismo, lograr este cultivo utilizando agua residual con el objeto de evitar la competencia del uso del agua para fines agrícolas, es de primordial importancia y representa un gran reto científico y tecnológico.

La presente revisión está enfocada a discutir las ventajas del uso de microalgas como fuente de materia prima para la producción

de biodiesel, además de las ventajas ambientales que ello conlleva, tales como las altas tasas de fijación de CO_2 y el tratamiento de aguas residuales, sin dejar de lado la discusión de algunos de los retos a nivel de proceso que aún se deben resolver, como los antes mencionados. No pretende ser una revisión exhaustiva, dado que este tema es muy actual y cada día se genera mucha información. Sin embargo, el objetivo general es proporcionar información actualizada con relación a los principales retos tecnológicos que se deben enfrentar y resolver para lograr producir biodiesel a partir de microalgas a un costo competitivo.

2. Aumento de los Gases de Efecto Invernadero (GEI) en la atmósfera

Las emisiones mundiales de los GEI por efecto de actividades humanas han aumentado desde la era preindustrial, registrándose un aumento de aproximadamente 70% entre 1970 y 2004.

El dióxido de carbono (CO_2) es el GEI antropogénico más importante. Sus emisiones anuales aumentaron aproximadamente un 80% entre 1970 y 2004, de tal manera que en la era preindustrial el valor era de aproximadamente 228 ppm y actualmente es de 385 ppm. Las emisiones de CO_2 originadas por actividades humanas proceden de diversas fuentes, en su mayor parte de la combustión de combustibles fósiles utilizados en la generación de energía, en el transporte vehicular, en los procesos industriales tales como la fabricación de cemento. La combustión de biomasa y la deforestación también juegan un papel muy importante (Jain, 2008; IPCC, 2005; IPCC, 2007) (Fig. 1).

En México, la combustión de energéticos es responsable de poco más del 61% de las emisiones de CO_2 y del 46% de los GEI (Alarco, 2006). Debido a esta problemática, la tendencia mundial es reducir al máximo el uso de combustibles fósiles y reemplazarlos con biocombustibles que sean renovables, no contaminantes y carbono neutrales.

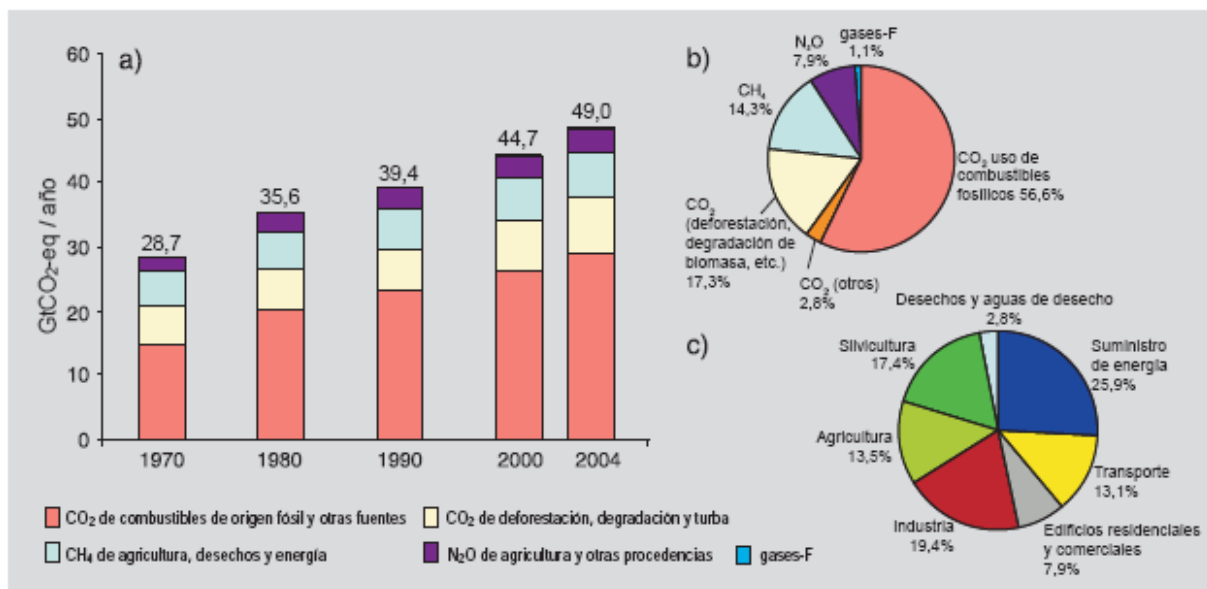


Figura 1. Emisiones mundiales anuales de GEI antropogénicos entre 1970 y 2004 (IPCC, 2007)

El aumento de los GEI en la atmósfera ha resultado en el aumento de la temperatura ambiental, tanto del aire como del océano, generando deshielo de los casquetes polares y el aumento promedio del nivel del mar. De acuerdo al documento técnico V del IPCC (IPCC, 2002), la temperatura media de la superficie de la Tierra ha aumentado en 0.6°C durante los últimos 100 años, siendo el año 1998 el más cálido y la década de los 90, muy probablemente la década más cálida.

El aumento de la temperatura también afecta a las actividades agrícolas (Morton, 2007), forestales (Kirilenko y Sedjo, 2007), a la salud humana (Ebi, 2008), a las actividades humanas en la región ártica (IPCC, 2007) y a algunos organismos terrestres particularmente vulnerables (Deutsch *et al.*, 2008). El impacto del calentamiento global en organismos y ecosistemas marinos ha sido ampliamente discutido por Brierley y Kingsford (2009).

3. Bioenergéticos

Los bioenergéticos de primera generación son una fuente sustentable de energía sólo cuando los insumos se cultivan de manera sustentable mediante “prácticas agrícolas amigables con la biodiversidad” y sólo se deberían promover los bioenergéticos con la menor huella ecológica. La huella ecológica de un país es el área total requerida para producir el alimento y fibra que consume, absorber los desechos de esa energía consumida y suministrar espacio para infraestructura (WWF, 2004). En el caso de los biocombustibles, la huella ecológica está en función de algunos factores, tales como eficiencia energética o balance neto de energía (energía generada/energía requerida) del ciclo de vida del bioenergético, combinado con su rendimiento por hectárea. Asimismo, las emisiones de los gases de efecto invernadero durante el ciclo de vida

del producto, los niveles requeridos de agua, fertilizantes y plaguicidas para el cultivo de la materia prima y la cantidad de energía requerida para cultivar y refinar la materia prima, son considerados también parte de la huella ecológica de un biocombustible (Groom *et al.*, 2008). Las mejores alternativas parecen ser los biocombustibles de segunda generación, es decir, aquellos que contribuyen en la reducción del uso de tierra debido a su potencial en rendimiento de energía por hectárea, que no requieren tierras cultivables y que no son empleados para consumo humano. Dentro de esta categoría se encuentran los residuos ligno-celulósicos, residuos agrícolas, la *Jatropha curcas* y especialmente las microalgas (Mata, *et al.*, 2010).

3.1 Biodiesel a partir de plantas

El biodiesel es una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de recursos renovables tales como aceites vegetales o grasas animales (ASTM, 6751-09). Esta definición también es aceptada por las especificaciones de la Unión Europea (estándar EU 14214). Puede usarse en su forma pura (B100) o en mezclas con diesel fósil que pueden ser del 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20). Las propiedades del biodiesel varían de acuerdo a la materia prima y entre las más sobresalientes y atractivas están su biodegradabilidad y no toxicidad, comparado con el diesel fósil. Frecuentemente, se considera que el balance de carbono en la producción de biodiesel a partir de plantas es neutral. Sin embargo, para mayor precisión, se debe tomar en cuenta el carbono utilizado en todo el ciclo de producción, respecto al liberado durante la combustión (Schenk *et al.*, 2008).

La razón principal por la cual los aceites vegetales no se pueden utilizar directamente en los motores diesel es por su alta viscosidad la cual está relacionada a su estructura química. Conforme aumenta la

longitud de la cadena carbonada de los lípidos, mayor es la viscosidad. Sin embargo, la viscosidad disminuye cuando aumenta el número de enlaces dobles (grado de insaturación). Existen cuatro procesos químicos que se utilizan para resolver el problema de viscosidad: dilución, microemulsificación, pirólisis y transesterificación, siendo este último el más recomendado y preferido (Canakci y Sanli, 2008; Shales, 2007). La reacción de transesterificación es la transformación de un triglicérido en un éster alquílico de ácidos grasos, en presencia de un alcohol (metanol o etanol) y un catalizador (un álcali o un ácido), obteniendo glicerol como subproducto. Las moléculas lineales del éster resultante reciben el nombre de biodiesel y están formadas por el éster del ácido graso y el alcohol. La reacción de transesterificación requiere de 3 moles de alcohol por cada mol de triglicéridos para producir 1 mol de glicerol y 3 moles de metil ésteres (biodiesel). El biodiesel obtenido tiene me-

nor viscosidad, menor masa molecular, menor intervalo de ebullición y menor punto de inflamación que el triglicérido original (Canakci y Sanli, 2008; Vasudevan y Briggs, 2008). En los procesos industriales se usan 6 moles de metanol por cada mol de triglicéridos para asegurar la producción de metil ésteres o biodiesel (Fukuda *et al.*, 2001). La figura 2 muestra un diagrama general de los procesos de producción de biodiesel.

La producción de biodiesel a partir de plantas tiene algunas limitaciones, como por ejemplo: a) está en conflicto con la utilización de aceites para alimento y b) su uso se ve limitado por las grandes extensiones de terreno necesarias para la producción de semillas oleaginosas. Además, para la producción de biodiesel sólo se emplea la semilla de la planta y el resto de la biomasa se desecha; además, los cultivos son dependientes de la estación del año y su ubicación geográfica (Adamczak *et al.*, 2009).

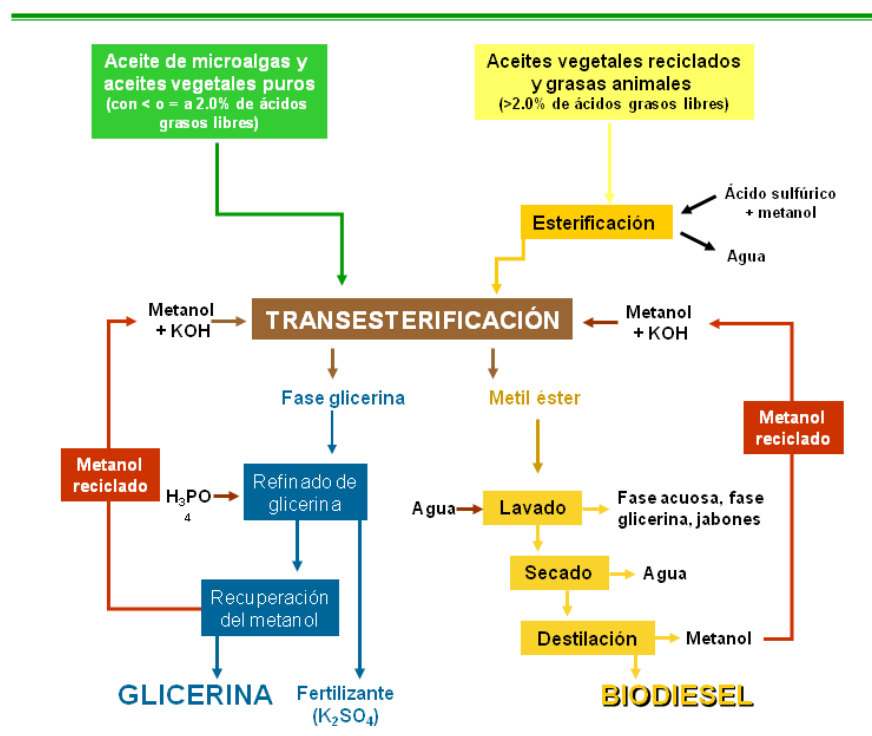


Figura 2. Diagrama de flujo de los procesos para producción de biodiesel.

3.2 Microalgas como fuente de biodiesel

Se ha reportado que diversos microorganismos tales como las levaduras *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporom pullulan* y *Yarrowia lipolytica* y bacterias del grupo actinomicetos tales como *Mycobacterium* spp., *Rhodococcus* spp. y *Nocardia* spp., son capaces de sintetizar triglicéridos intracelulares, bajo ciertas condiciones de cultivo, hasta en un 80% de su peso seco utilizando diversas fuentes de carbono (azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y aceites entre otras) y diferentes subproductos y/o residuos industriales o agrícolas (suero de leche, hidrocarburos, aceites vegetales, melazas de caña de azúcar, salvado de trigo, desechos de frutas y verduras.) (Li *et al.*, 2008a; Adamczak *et al.*, 2009). El problema al utilizar este tipo de microorganismos, es el costo de producción, dado que requieren un alto consumo de oxígeno. En contraste, en las últimas décadas se ha destacado que las microalgas representan una alternativa más conveniente que cualquier otro tipo de organismo para la producción de triacilglicéridos y su conversión a biodiesel, ya que algunas especies oleaginosas, siendo organismos fotosintéticos, sólo requieren energía solar, agua, CO₂ y algunas sales para producir muy altos rendimientos de biomasa rica en lípidos (Li *et al.* 2008a). De hecho, son los organismos fotosintéticos más eficientes, absorben más CO₂ y liberan más O₂ que cualquier planta, crecen extremadamente rápido y llegan a acumular grandes cantidades de diversos productos. Algunas microalgas doblan su biomasa en 24 h y el tiempo de duplicación de biomasa durante la fase exponencial puede ser tan corto como 3.5 h (Chisti, 2007). De manera más específica, los beneficios que se obtienen al

usar microalgas para la producción de biodiesel son:

a) Las microalgas tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional. Es de 10 a 20 veces mayor que el derivado del aceite de palma y de 200 a 400 veces mayor que el derivado del aceite de soya (Fig. 3).

b) Sólo este bioenergético tiene una verdadera huella ecológica pequeña, dado que requiere una superficie de 1-2 órdenes de magnitud menores en comparación a los cultivos convencionales o los árboles. Requiere de 1.5 a 3.2 millones de hectáreas (M has) para satisfacer el 50% de las demandas de energéticos de transportación en U.S.A. (Chisti, 2007). En contraste, la soya, principal fuente de biodiesel en U.S.A. requiere de 330 a 450 M has para un propósito similar. En México, se ha estimado que sólo se requiere el 1% de la superficie total del país, para cubrir el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo (Garibay *et al.*, 2009).

c) Con biodiesel de microalgas cultivadas en lagunas abiertas (LA), sólo se requieren 200,000 has para producir 1 cuadrillón de BTU (Sheehan *et al.*, 1998). En contraste, se requieren aproximadamente 40 millones de has si se utiliza etanol derivado de maíz o 20 millones de has si se utiliza biodiesel derivado de frijol de soya.

d) Las microalgas oleaginosas pueden ser cultivadas en agua de mar o en agua salobre, disminuyendo así la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimento. Algunas otras especies aisladas de agua dulce, pueden crecer en aguas residuales, también eliminando la competencia por el uso de agua para la agricultura.

e) Las microalgas son excelentes captadoras de CO₂. Por cada 100 ton de microalgas producidas, se consumen 183 ton de CO₂ (Chisti, 2007).

f) Con relación a la emisión de gases invernadero, es de los pocos bionergéticos con un valor negativo. Es decir, no se produce CO_2 durante el ciclo de vida de producción y el valor de este parámetro para microalgas ($-183 \text{ kgCO}_2/\text{MJ}$) es el más negativo respecto a los otros bionergéticos

con valores negativos (etanol a partir de pastos o de residuos celulósicos). En contraste, el diesel a partir de fuentes fósiles produce $83 \text{ kgCO}_2/\text{MJ}$ y el etanol a partir de maíz produce $81\text{-}85 \text{ kgCO}_2/\text{MJ}$ (Chisti, 2007).

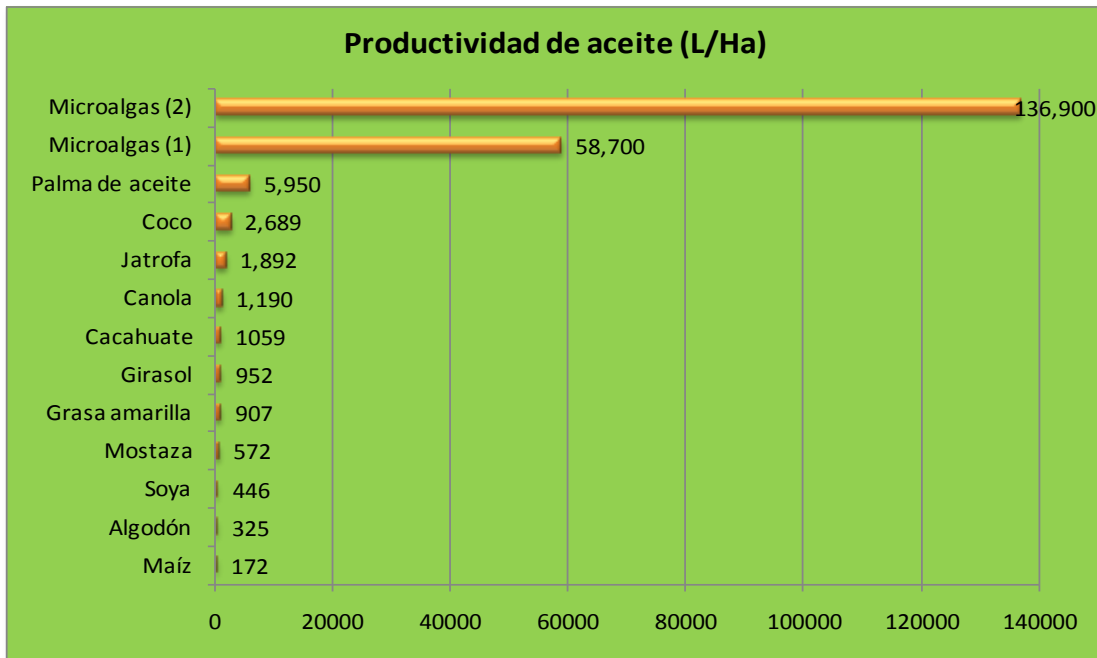


Figura 3. Productividad de aceite de las microalgas en comparación con los cultivos convencionales (Gao *et al.*, 2009; Schenk *et al.*, 2008; Chisti, 2007)

(1) 30% de aceite en biomasa (con base a peso seco); (2) 70% de aceite en biomasa (con base a peso seco)

4. Retos y oportunidades en la producción de biodiesel con microalgas

Algunos de los parámetros claves que afectan la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas son: la productividad de la biomasa microalgal, el contenido celular de lípidos y sobre todo, la productividad de lípidos (especialmente los triacilglicéridos). Este último parámetro determina el costo del proceso de cultivo, mientras que la concentración de la biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos, afectan significativamente el costo de los procesos

de extracción y transformación. Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li *et al.*, 2008b). Desafortunadamente esta situación ideal es muy difícil de encontrar en la práctica, dado que las células con alto contenido de lípidos son producidas bajo condiciones de estrés fisiológico, el cual está asociado a condiciones limitantes de nutrientes y por lo tanto, de baja productividad de biomasa y de lípidos.

Por lo anterior, los mayores retos en el desarrollo de procesos para la producción de biodiesel con microalgas consisten en:

a) seleccionar las mejores cepas, en términos de máximo contenido de lípidos y máxima productividad, mejor perfil de lípidos y adaptabilidad al tipo de agua a utilizar y a las condiciones ambientales;

b) establecer estrategias de cultivo adecuadas que permitan lograr la máxima productividad de lípidos y de biomasa;

c) lograr el uso de aguas residuales, evitando contaminaciones;

d) seleccionar el tipo de reactor más adecuado o una combinación de ellos, para máxima producción de biomasa al mínimo costo;

e) lograr abatir los costos de cosecha, y

f) lograr una extracción de lípidos y su conversión a biodiesel, mediante estrategias de mínimo costo.

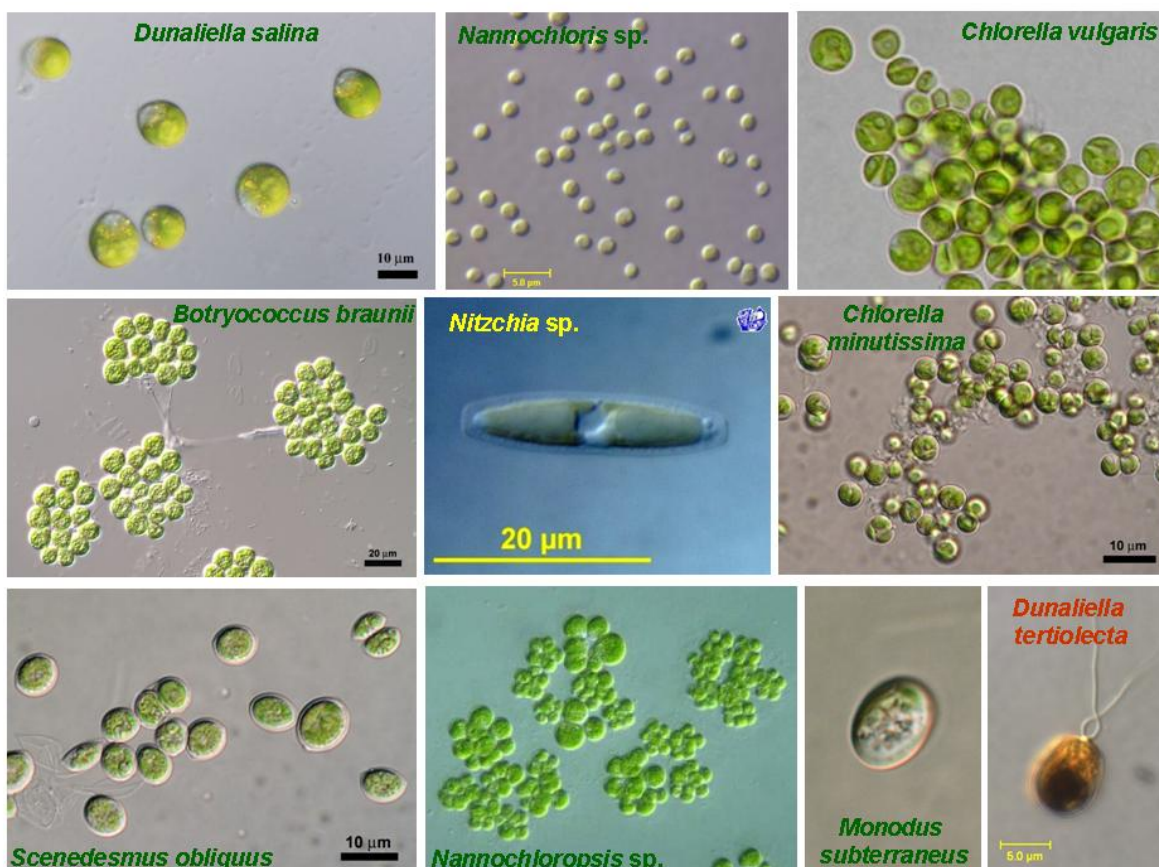


Figura 4. Algunas de las especies de microalgas que se pueden emplear para la producción de biodiesel. Fotos de *Dunaliella salina*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella minutissima* y *Monodus subterraneus* (Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA) <http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php>); fotos de *Nannochloris* sp., *Nitzschia* sp. y *Dunaliella tertiolecta* (Plancton Oceanique Station Biologique of Roscoff <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/>); foto de *Chlorella vulgaris* (Culture Collection of Algae, Charles University in Prague (CAUP) <http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-gallery.html>) y foto de *Nannochloropsis* sp. (Ben-Amotz, 2009).

4.1 Selección de la especie de microalgas con mejores atributos

La elección de la especie es el primer paso para el desarrollo de un proceso de producción, ya que el éxito depende principalmente de ello. La especie debe tener

las características adecuadas para condiciones de cultivo muy particulares para obtener productos específicos. Entre las principales características deseables para cultivos a gran escala están: crecimiento rápido, alto contenido de productos de alto

valor agregado, desarrollo en ambientes extremos, células grandes en colonias o filamentos, gran tolerancia a condiciones ambientales, tolerancia a niveles altos de CO₂ (15% o más), a contaminantes y al efecto físico de la agitación o turbulencia. Además, no debe excretar autoinhibidores (Griffiths y Harrison, 2009) (Fig. 4).

El Departamento de Energía de Estados Unidos financió de 1978 a 1996 un programa para desarrollar combustibles renovables a partir de algas. El objetivo principal del programa, denominado *Programa de Especies Acuáticas*, fue la producción de biodiesel a partir de algas con alto contenido de aceite, cultivadas en estanques al aire libre utilizando el CO₂ liberado de centrales termoeléctricas que usaban carbón como combustible. Aislaron más de 3,000 especies con especial interés en cepas productoras de lípidos; finalmente

no se hizo ninguna recomendación en cuanto a la mejor especie, pero si se reportó que el rendimiento por acre de aceite de microalga es aproximadamente 200 veces mayor que el máximo rendimiento de cualquier cultivo oleaginoso (Sheehan *et al.*, 1998)

Posteriormente, se han descrito listas numerosas de cepas de origen marino o dulceacuícolas que muestran un alto contenido de lípidos (Chisti, 2007) y existen diversos estudios con especies del género *Chlorella* (Liu *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008), con especies de *Dunaliella* (Takagi *et al.*, 2006), de *Nannochloris* (Takagi *et al.*, 2000) y con *Botryococcus braunii* (Li y Qin, 2005) por mencionar algunos de ellos. *Nannochloris* y *Dunaliella* son especies marinas con buenas ventajas para ser cultivadas en zonas costeras. La tabla 1 muestra las diferencias del contenido de aceite en algunas especies de microalgas.

Tabla 1. Contenido de aceite de algunas especies de microalgas.

Especie	Contenido de aceite (% del peso seco)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referencia
<i>Parietochoris incisa</i> (d)	60 ^a	NR	Solovchenko <i>et al.</i> (2008)
<i>Nannochloropsis</i> sp. (m)	60 ^a	204	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (d)	56 ^a	13.22	Gouveia <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	~42 ^a	12.77	Widjaja <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptocodinium cohnii</i> (m)	41.14 ^a	82	Mendoza <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i> (d)	43 ^b	NR	Mandal y Mallick (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (d)	38 ^c	133	Li <i>et al.</i> (2008c)
<i>Nannochloropsis</i> sp. (m)	28.7 ^c	90	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	27 ^c	127.2	Francisco <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i> (m)	30.7 ^c	151	Chiu <i>et al.</i> (2009)
<i>Dunaliella</i> (m)	67 ^c	33.5	Takagi <i>et al.</i> (2006)
<i>Choricystis minor</i> (d)	21.3 ^c	82	Mazzuca-Sobczuk y Chisti (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i> (d)	50.3 ^d	NR	Xiong <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	21 ^d	54	Liang <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i> (m)	73 ^e	NR	Matsunaga <i>et al.</i> (2009)

^a Cultivo bajo supresión de nitrógeno; ^b Cultivo bajo deficiencia de nitrógeno; ^c Cultivo con suficiencia de nutrientes; ^d cultivo heterotrófico; ^e Ausencia de nutrientes. m = marina y d = dulceacuícola; NR = no reportado

Recientemente, Rodolfi *et al.* (2009), investigaron 30 especies para seleccionar aquellas con alta productividad en biomasa y alto contenido de lípidos, encontrando que *Nannochloropsis* sp., una especie marina, es particularmente promisoría para la producción de aceite. De igual manera, Gouveia y Oliveira (2009), investigaron 6 especies de microalgas tanto marinas como dulceacuícolas para elegir en términos de cantidad y calidad de aceite la mejor materia prima para la producción de biocombustibles.

Neochloris oleoabundans (dulceacuícola) y *Nannochloropsis* sp. (marina) fueron las que mostraron mayor contenido de lípidos (29 y 28.7%, respectivamente), lo cual las sitúa como adecuadas para tal fin. Últimamente, varios grupos de investigación han incursionado en la línea de investigación para generar cepas genéticamente mejoradas. Aunque la aplicación de la ingeniería genética para mejorar la producción de lípidos en fenotipos de eucariontes, se encuentra en etapas muy tempranas, ya se han desarrollado herramientas de manipulación genética en ciertos sistemas modelo para manipular el metabolismo central del carbono en estos organismos (Radakovits *et al.*, 2010). Sin embargo, es posible que los resultados de esta estrategia sean de mediano y largo plazo, considerando que se ha enfatizado que todavía se requiere mucho conocimiento para posteriormente lograr manipular el metabolismo de lípidos en algas (Greenwell *et al.*, 2010.)

4.2 Inducción del aumento de la productividad de lípidos

Las microalgas sintetizan ácidos grasos como precursores para la síntesis de varios tipos de lípidos, los cuales varían dependiendo de la especie: lípidos polares, lípidos neutrales, ceras, esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, carotenoides, terpenos, tocoferoles, quinonas (Hu *et al.*, 2008). Sin embargo, sólo los lípidos neutrales son

adecuados para la producción de biodiesel y de éstos, los triacilglicéridos.

El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007). Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo; los físicos son la temperatura y la intensidad luminosa. La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos (De *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008c; Hu *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008). Con respecto a la fase de crecimiento, Bigogno *et al.* (2002) reportaron que en *Parietochloris incisa* se observó un alto contenido de triacilglicéridos (43% del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, el cual aumentó hasta 77% en la fase estacionaria.

La influencia de la deficiencia de nitrógeno sobre la síntesis de lípidos fue descrita primero en algas verdes (Shifrin y Chisholm, 1980), aunque estudios posteriores también lo han demostrado con cianobacterias. Olgúin *et al.*, (2001), reportaron que el contenido de lípidos totales de *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) aumentó de 8% a

28.6% del peso seco, cuando se sometió a una limitación por N y además se cultivó a una intensidad luminosa muy baja ($66 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en un medio com-plejo. En relación a microalgas verdes, en el género *Dunaliella*, se ha descrito que su principal lípido de reserva son los triglicéridos y que bajo condiciones de limitación de nitrógeno y con 1% de CO_2 , éstos aumentaron del 1% al 22%, respecto a los lípidos totales (Gordillo *et al.*, 1998). Asimismo, *Neochloris oleoabundans* puede acumular hasta el 80% de sus lípidos totales en forma de triglicéridos y la mayoría de sus ácidos grasos son saturados en el rango de 16 a 20 carbonos, bajo condiciones de estrés (Tornabene *et al.*, 1983), lo cual la coloca como una de las especies con mayor potencial para la producción de biodiesel. También se ha reportado que la adición de 2% de CO_2 estimuló la acumulación de ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) en la microalga marina *Nannochloropsis* sp. (Hoshida *et al.*, 2005).

Entre otros estudios relacionados también a la inducción de lípidos del tipo TAG (triacilglicéridos) bajo condiciones de limitación de nitrógeno, destacan los realizados con *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) por el grupo de Cohen en Israel. En uno de sus trabajos, encontraron que *P. incisa*, acumula ácido araquidónico (AA) (20:4) y que hasta el 90% del total del AA está depositado en forma de TAGs. Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, el contenido de ácidos grasos alcanzó el 35% del peso seco y el AA excedió el 60% de los ácidos grasos (Khozin-Goldberg *et al.*, 2002). Recientemente, se describió que a una alta intensidad luminosa, se alcanzaron los más altos contenidos de ácidos grasos totales y que bajo deficiencia de nitrógeno, aumentó de manera significativa el contenido de AA respecto al total de ácidos grasos (Solovchenko *et al.*, 2008).

Finalmente, muy pocos estudios sobre la inducción de lípidos por limitaciones de nutrientes se han realizado en condiciones exteriores con reactores a escala piloto. Después de hacer crecer bajo condiciones limitantes de nitrógeno a dos cepas marinas y a dos cepas de agua dulce, Rodolfi *et al.*, (2009), seleccionaron a *Nannochloropsis* sp por haber acumulado el 60% de lípidos bajo estas condiciones. En experimentos realizados con fotobiorreactores (FBRs) de 110 litros, se compararon las productividades tanto en medio suficiente de nitrógeno, como en medio deficiente. Se encontró que en el primer medio, esta microalga marina contenía 32 % de lípidos, con una productividad de biomasa de $0.36 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y una productividad de lípidos de $117 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En contraste, en condiciones limitadas de nitrógeno, el contenido de lípidos aumentó al 60% y la productividad de lípidos a $204 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, aunque la productividad de biomasa disminuyó a $0.3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Los autores señalaron que se pueden obtener entre 20 y 30 ton de lípidos por hectárea, aunque estos datos deben considerarse con reserva, dado que la unidad experimental utilizada para generarlos fue de un volumen de 110 litros.

Con respecto a la temperatura, se ha observado en muchas algas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y viceversa, cuando la temperatura aumenta, aumenta la saturación de los ácidos grasos. Con relación al efecto de la intensidad luminosa, ésta influye notablemente en la composición química en general, el contenido de pigmentos y en la actividad fotosintética. Generalmente, una intensidad luminosa baja induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), los cuales están funcional y estructuralmente asociados a las membranas celulares (Hu *et al.*, 2008).

En contraste, las altas intensidades luminosas influyen en la disminución del contenido total de lípidos polares con el concomitante incremento de la cantidad de lípidos de almacenamiento, principalmente triglicéridos (Olgúin *et al.*, 2001; Khotimchenko y Yakovleva, 2005; Solovchenko *et al.*, 2008).

4.3 Uso de las microalgas como estrategia para la mitigación del CO₂ y el tratamiento de aguas residuales

La capacidad de las microalgas para fijar el CO₂ es de 10 a 50 veces mayor que la de las plantas terrestres, por tal motivo, las microalgas consumen la mayor cantidad de CO₂ en todo el planeta (Wang *et al.*, 2008). Aproximadamente la mitad de la biomasa en peso seco de las microalgas, es carbono derivado del CO₂, por lo tanto, por cada tonelada producida de biomasa algal (peso seco), se consumen de 1.3 a 1.8 toneladas de CO₂ (Chisti, 2008).

La mitigación del CO₂ con microalgas puede ser económicamente más rentable y ambientalmente

sustentable cuando el proceso se combina con otro como el tratamiento de aguas residuales (Harmelen y Oonk, 2006; Wang *et al.*, 2008). La combinación del tratamiento de aguas residuales y la fijación del CO₂ con el cultivo de microalgas provee un incentivo adicional debido a la reducción de compuestos tales como nitratos y fosfatos, ya que las microalgas son capaces de remover eficientemente el nitrógeno y el fósforo así como algunos metales pesados (Mallick, 2002; Olgúin, 2003; Larsdotter, 2006; Powell *et al.*, 2008). Por lo tanto, la combinación del cultivo de microalgas con el tratamiento de aguas residuales incrementa el beneficio ambiental de la mitigación del CO₂, resultando además en la preservación de los valiosos recursos hídricos, ya que en muchas ocasiones, el agua residual sin tratar, rica en nitrógeno y fósforo, se vierte a los cuerpos de agua, resultando en la eutrofización de ríos y lagos y el surgimiento de microalgas nocivas (Wang *et al.*, 2008; Wogan *et al.*, 2008) (Fig. 5).



Figura 5. La producción de biodiesel a partir de microalgas puede contribuir a la mitigación de CO₂ y al tratamiento de aguas residuales en un proceso rentable y ambientalmente sustentable.

El uso de microalgas para tratamiento de diversos tipos de aguas residuales, ha sido objeto de estudios en la última década (Phang *et al.*, 2000; Grönlund, 2002; Olgúin *et al.*, 2003; Olgúin, 2003; Bécares, 2006; Hu y Sommerfeld, 2004; Asplund, 2008; González *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2008) y más recientemente con el doble propósito de tratarlas y de producir biomasa algal para la producción de biocombustibles (Bhatnagar *et al.*, 2010; Johnson y Wen, 2010; Li *et al.*, 2010). Sin embargo, en este último caso, debe tomarse en cuenta que pueden presentarse problemas adicionales tales como contaminación del cultivo y toxicidad

de algunos compuestos presentes en las aguas residuales.

4.4 Selección del tipo de reactor más adecuado para el cultivo de microalgas oleaginosas

La producción de microalgas oleaginosas con el objeto de obtener biodiesel se puede realizar tanto en reactores cerrados, generalmente llamados fotobiorreactores (FBRs) o en reactores abiertos, conocidos como *raceways* o Lagunas Abiertas (LA) que tienen el mismo diseño que las Lagunas de Oxidación de Alta Tasa (LOATs) (Fig.6).

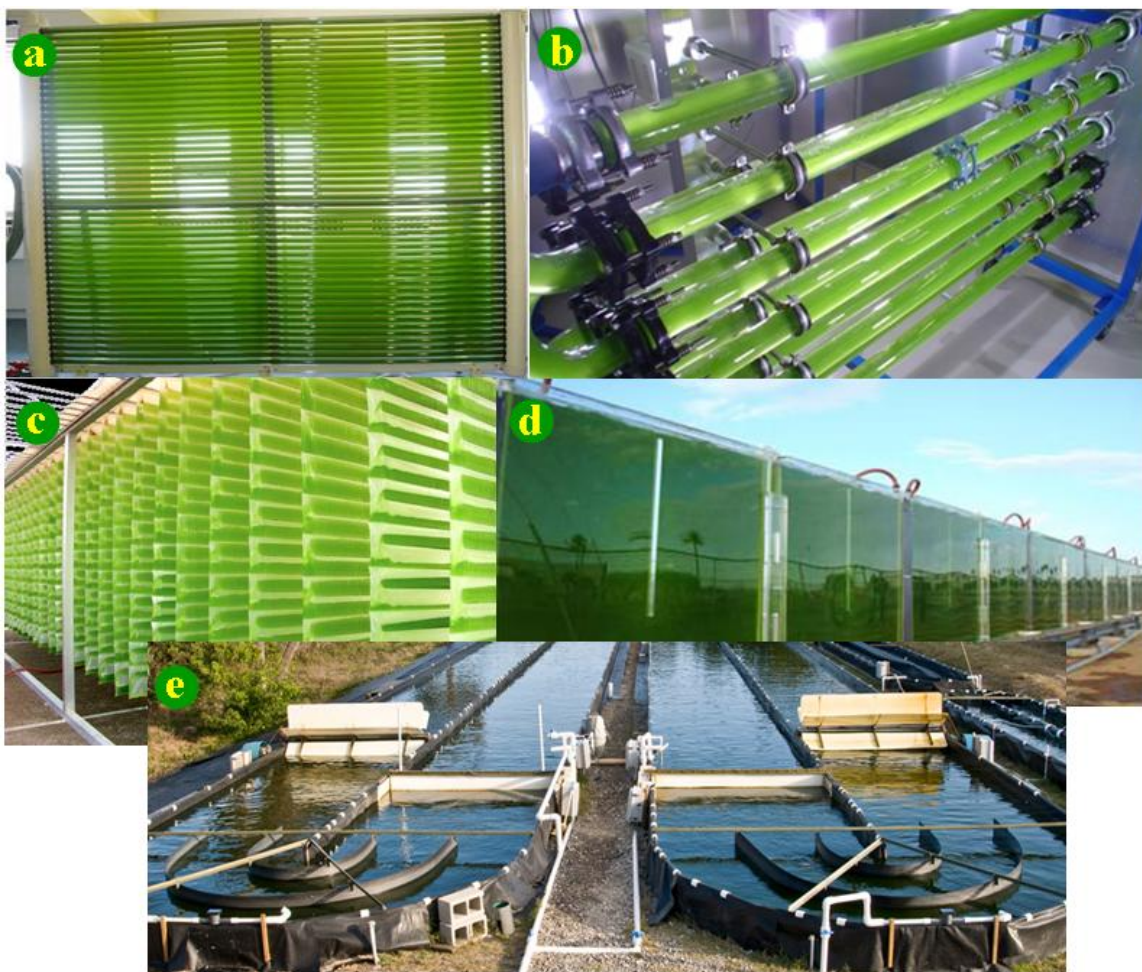


Figura 6. Tipos de reactores para el cultivo masivo de microalgas. a) FBR tubular (<http://www.ebri.org.uk/index.html>); b) FBR tubular (<http://www.oilgae.com/>); c) Vertical Algae Technology (VAT) (<http://www.valcent.net/s/Home.asp>); d) FBR tipo placa (<http://biofuels.asu.edu/biomaterials.shtml>) y e) Lagunas abiertas (LA) también conocidas como “*raceways*” (<http://www.aurorabiofuels.com/>).

Las LOATs y las LA son de forma elipsoidal con una separación central que permite formar canales poco profundos en forma de circuito cerrado; se mantienen en agitación mediante paletas giratorias y en ocasiones, cuentan con mecanismos para suministrar CO₂ y nutrientes. Las principales ventajas son el bajo costo de construcción, de operación y de producción de biomasa. Sin embargo, tienen varias desventajas: requieren de grandes áreas de terreno, sufren importantes pérdidas de agua por evaporación, y de CO₂ por difusión a la atmósfera, el sistema de mezclado es deficiente lo que origina una baja concentración celular, la cual a su vez, origina una baja productividad. Ésta última también resulta afectada por contaminación con otras algas y/o por organismos que se alimentan de microalgas; costosa recuperación del producto de medios diluidos y dificultad para el control de la temperatura y el pH. Estas desventajas de las lagunas abiertas estimularon el desarrollo de diversos tipos de fotobiorreactores, los

cuales son sistemas cerrados que permiten un control más preciso de las condiciones de cultivo, (Chisti, 2007; Wogan *et al.*, 2008; Ugwu *et al.*, 2008), el cultivo de una sola especie por tiempos prolongados, la obtención de una alta productividad de biomasa y se puede evitar la contaminación (MolinaGrima *et al.*, 1999; Ugwu *et al.*, 2008).

La mayoría de los FBRs expuestos a condiciones ambientales exteriores se caracterizan por tener grandes áreas de iluminación y desde este punto de vista, los tipo placa plana y los tubulares horizontales inclinados son los mejores, excepto por la dificultad de escalamiento, mientras que los de columna de burbujeo, los *airlift* y el tipo tanque agitado son de fácil escalamiento, pero tienen áreas de iluminación menores respecto al resto de los FBRs (Ugwu *et al.*, 2008). La figura 7 muestra una comparación de diversos parámetros de diseño y costo entre los fotobiorreactores de tipo placa plana y tubulares, así como de las LA o *raceways*.

FOTOBIORREACTORES			
	ABIERTOS	PLANOS	TUBULARES
Volumen (m ³)	10 ³	5.0	5.0
Gas holdup	0.01	0.02	0.01
Coefficiente de transferencia de masa (1/s)	0.010	0.010	0.005
Coefficiente de dispersión (m ² /s)	0.0001	0.030	0.040
Tiempo de mezclado (s)	10 ⁴	150	10 ⁵
Energía (W/m ³)	1	50	100
Pb _{vol} (g/L/día)	0.1	0.6	1.0
Costo (€/m ³)	500	3000	10000




Figura 7. Algunas características de las Lagunas Abiertas (LA) y los fotobiorreactores de placa plana y fotobiorreactores tubulares (Molina Grima y Acién (2009), comunicación personal)

Por otro lado, es importante mencionar que existen numerosos reportes en la literatura sobre el uso de FBRs para la producción de microalgas, aunque la mayoría son experiencias a nivel laboratorio y muy pocas a nivel de planta piloto (Rodolfi *et al.*, 2009). Las revisiones sobre este tema son diversas. Chisti (2007) favorece el uso de FBRs y sin embargo otros expertos que han tenido años de experiencias de cultivo de microalgas a escala comercial defienden ampliamente el uso de las lagunas abiertas o *raceways* (Ben-Amotz, 2009; Benneman, 2008).

El debate se centra fundamentalmente en dos aspectos: los FBRs son mucho más productivos que las LA y permiten controlar mejor las posibles contaminaciones y sin embargo, son mucho más costosos, lo que impide un costo adecuado de producción de

biomasa (ver sección de factibilidad económica). El resultado de esta situación es que los procesos desarrollados en reactores cerrados no son rentables todavía a gran escala y algunas experiencias comerciales de este tipo han fracasado en los últimos años (ejemplo: planta en Alemania del Dr. Otto Pulz). De hecho, todas las plantas de producción de microalgas a gran escala operando actualmente, utilizan LA para la producción de astaxantina, ferredoxina, beta caroteno y ficocianina (Carvalho *et al.*, 2006) y también para producción de biomasa de *Spirulina* (*Arthrospira*) grado consumo humano y acuicultura (Belay, 1997). La figura 8 muestra la producción de *Nannochloropsis* sp. a escala comercial para la producción de biodiesel por la empresa Seambiotics Ltd. (Israel), utilizando lagunas abiertas.

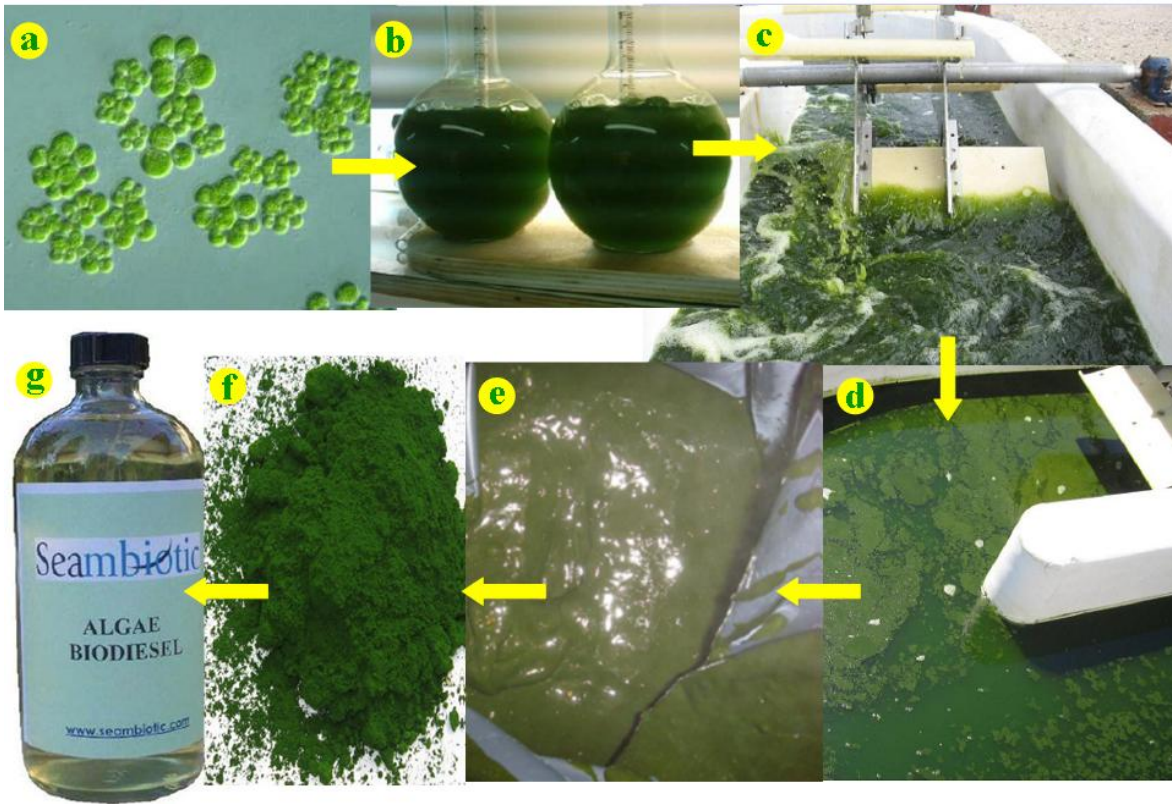


Figura 8. Cultivo de *Nannochloropsis* sp. en lagunas abiertas (LA) para la producción de biodiesel en Israel (Seambiotic Ltd.). a) *Nannochloropsis* sp., b) cultivo en laboratorio, c) cultivo en LOATs, d) co-bio-floculación, e) cosecha de biomasa, f) *Nannochloropsis* sp. seca y g) biodiesel. (Ben-Amotz, 2009)

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las lagunas abiertas y los fotobiorreactores para producción de biomasa algal (Ma, 2009).

TIPO DE REACTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Lagunas Abiertas	Sencillos y baratos de construir Fáciles de operar y mantener	Utilización deficiente de la luz Luz y temperatura difíciles de controlar Contaminación y evaporación
Fotobiorreactores	Alta productividad Menor contaminación, menor uso de agua y menor pérdida de CO ₂ Mejor utilización de la luz y mejor mezclado Control en las condiciones de cultivo	Costosos y complejos Difícil control de la temperatura Daño celular por turbulencia Deterioro de materiales Deterioro de equipo por corrosión biológica Acumulación de oxígeno

En resumen, las ventajas y desventajas de ambos tipos de reactores se muestran en la tabla 2 (Ma, 2009).

Una manera de evitar algunas de las principales desventajas del uso de las lagunas abiertas y de los fotobiorreactores, es optar por un cultivo que integra ambos sistemas, el sistema de cultivo híbrido (Schenk *et al.*, 2008). La combinación de ambos sistemas es probablemente la elección más adecuada para obtener la mayor productividad tanto de biomasa como de lípidos, ya que la mayoría de las microalgas no acumulan biomasa ni producen lípidos de manera simultánea. Este sistema se realiza en dos etapas, en la primera se incrementa la densidad celular y en la segunda se incrementa la acumulación de lípidos. La primera etapa se lleva a cabo en sistemas cerrados (FBRs), que pueden ser desde simples bolsas de plástico hasta FBRs de alta complejidad. El objetivo en esta etapa, es obtener la mayor densidad celular posible y minimizar el riesgo de contaminación, bajo condiciones de suficiencia de nutrientes. La segunda etapa se realiza en lagunas abiertas usando el inóculo producido en el primer paso y se estimula la biosíntesis de lípidos bajo condiciones de limitación de nutrientes. El resultado esperado es una alta densidad celular y un alto contenido de aceite (Ryan, 2009). Este sistema fue adaptado exitosamente para el cultivo a escala

comercial (2 ha) de *Haematococcus pluviialis* para la producción de astaxantina y aceite (Huntley y Redalje, 2007).

4.5 Cosecha de biomasa celular y extracción de lípidos

Se conoce ampliamente que uno de los cuellos de botella y retos a vencer más importante respecto a la producción de biomasa microalgal y de metabolitos en particular, consiste en la cosecha y extracción de los mismos. Incluso, en procesos de tratamiento de aguas con microalgas, el costo de la cosecha determina la viabilidad económica de todo el proceso (Olgúin, 2003). Se considera en general que los problemas básicos son: a) el tamaño de las microalgas (entre 3 y 30 μm); b) el que los cultivos tienen una densidad celular relativamente baja, especialmente en las lagunas abiertas ($< 0.5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de biomasa seca) y se requiere cosechar grandes volúmenes de líquido y c) que el costo de la cosecha contribuye de una manera muy importante (del 20 al 40%), al costo total de producción de la biomasa. En el caso de algunos metabolitos o nutracéuticos de alto valor agregado como el ácido eicosapentanoico (EPA en inglés), el costo de recuperación asciende a 60% del costo total de producción (Molina Grima *et al.*, 2003).

Los métodos más comunes de cosecha de la biomasa algal incluyen centrifugación (especialmente en el caso de las microalgas unicelulares), filtración cuando se han formado flóculos o se trata de microalgas o cianobacterias relativamente grandes o filamentosas y en algunos casos, sedimentación por gravedad, flotación o técnicas de electroforesis. Sin embargo, la centrifugación es el proceso más costoso y generalmente se aplica sólo cuando se recuperan metabolitos de alto valor agregado (Uduman *et al.*, 2010). En consideración a que la mayoría de las microalgas oleaginosas son pequeñas o no filamentosas, la filtración no es un método fácilmente aplicable a la producción de biodiesel a partir de microalgas. En contraste, en la actualidad, la floculación con ciertas modificaciones a la floculación tradicional que utiliza sales metálicas que contaminan la biomasa, está siendo investigada por diversos grupos de investigación.

La recuperación de biomasa microbiana por floculación, se basa en el hecho de que la superficie de todas las bacterias, cianobacterias y microalgas están cargadas negativamente debido a la presencia de polisacáridos extracelulares (Lee *et al.*, 2009). En el caso de las cianobacterias, se ha determinado que los polisacáridos extracelulares son heteropolímeros aniónicos complejos que en su mayoría contienen ácido urónico y otras moléculas peptídicas, radicales acetilo, pirúvico o derivados sulfatados (De Philippis *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los métodos de floculación no son adecuados para la cosecha de biomasa algal para la producción de un bien de bajo costo como el biodiesel, y algunos de ellos muestran interferencia con el agua de mar (Lee *et al.*, 2009). En consideración a estos aspectos, se desarrolló un proceso para la recuperación de la microalga marina *Pleurochrysis carterae*, del grupo de los coccolitofóridos, en el que se

utilizaron compuestos carbonados de fácil disponibilidad, tales como el acetato, el glicerol y la glucosa para cultivarla y promover la formación de polisacáridos extracelulares y la floculación de las células. El proceso es prometedor dado que se encontraron buenos porcentajes de recuperación de más del 90% y un factor de concentración de 226 (Lee *et al.*, 2009). Por otro lado, Vandamme *et al.* (2010), reportaron que el uso de almidón catiónico fue muy eficiente para flocular microalgas de agua dulce (*Parachlorella*, *Scenedesmus*) pero no para flocular microalgas marinas (*Phaeodactylum*, *Nannochloropsis*). Además, encontraron que de los floculantes de tipo de almidón catiónico disponibles en el mercado, el Greenfloc 120 fue más eficiente que el Cargill C*Bond.

Por otro lado, se ha recomendado el uso de otros procesos no convencionales para la recuperación a bajo costo de *Chlorella* para producción de biodiesel. Johnson y Wen (2010) reportaron el cultivo de esta microalga sobre una superficie de espuma de poliestireno, logrando una productividad de biomasa de 25.65 gm⁻² en base seca y un rendimiento de ácidos grasos de 2.31 gm⁻² a escala laboratorio. Aunque este método no convencional parece prometedor, faltan estudios a mayor escala en los que se resuelva de manera viable el raspado de las placas de poliestireno que se colocan en la base de las superficies de cultivo.

En relación a la extracción de los lípidos intracelulares, este proceso se puede realizar con o sin rompimiento celular previo. El rompimiento celular puede llevarse a cabo por métodos tradicionales como el uso de la “prensa francesa” que utiliza altas presiones o por un método más moderno que es la electroporación, en el cual se aplica un campo eléctrico a las células para lograr perforaciones en su pared celular. La extracción de los lípidos se puede realizar con solventes químicos en una o dos etapas

(Schenk *et al.*, 2008). Tran *et al.* (2009), evaluaron cinco métodos diferentes ya descritos en la literatura y concluyeron que el más adecuado para extraer los lípidos de *Botryococcus braunii* y de *Synechocystis* sp., fue un método de un solo paso con derivatización para formar metil ésteres “*in situ*”. Recientemente, se describió el uso exitoso de solventes de polaridad intercambiable (switchable-polarity solvents (SPS) para extraer los lípidos de *Botryococcus braunii* (Samori *et al.*, 2010). La mezcla DBU/octanol mostró los rendimientos de recuperación más altos, tanto de células liofilizadas como de muestras líquidas (16% and 8.2% respectivamente), en comparación con extracción con n-hexano (7.8% y 5.6%, respectivamente).

Es importante mencionar que la extracción con solventes no es amigable con el ambiente, especialmente por las emisiones a la atmósfera y por la disposición final del mismo. En consideración a lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos de extracción tales como el Proceso de Extracción Acuosa (AEP en inglés), el cual ofrece las ventajas de una inversión menor de capital, una operación más segura y una producción simultánea de aceite y de fracciones ricas en proteína con menos daño. Más aún, se han utilizado diversas enzimas para mejorar la extracción de lípidos en este tipo de proceso, alcanzando porcentajes de recuperación hasta del 90% (de Moura *et al.*, 2008).

Por otro lado, en relación a las reacciones de transesterificación por vía enzimática, se ha descrito que el uso de lipasas comerciales (Novozymes) de origen microbiano y en especial la lipasa N435 obtenida de *Candida antarctica* e inmovilizada en soporte hidrofóbico, fue la más eficiente tanto en el sistema libre de solvente como en el sistema con terbutanol como solvente, para la

transesterificación de ácidos grasos de origen animal (Rivera *et al.*, 2009).

5. Factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas

La factibilidad económica de este producto está en función del precio del petróleo, dado que el diesel del petróleo es el principal producto con el que tiene que competir. Los costos del barril de petróleo han sido muy variables en los dos últimos años puesto que han estado sujetos a las presiones de la economía internacional. La OPEP ha previsto que el consumo de crudo se mueva al alza, tras 2 años consecutivos de descensos y alcance los 85.13 millones de barriles por día y ha insistido en considerar aceptable un precio de 75 a 85 dólares por barril para el 2010. De hecho, el precio del petróleo crudo de Texas alcanzó los \$ 82.50 dólares por barril el 18 de Marzo del 2010 (Preciopetroleo.net). Dentro de este escenario, en el que los precios del petróleo están al alza, la viabilidad del biodiesel a partir de microalgas es más factible. Sin embargo, la limitante principal continúa siendo el costo de la producción de biomasa como lo han indicado previamente varios autores (Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009; Garibay *et al.*, 2009). Esta es la razón por la cual ninguna de las 50 empresas que han surgido para producir este tipo de biodiesel, lo producen aún a escala comercial y a costos competitivos (Pienkos y Darzin, 2009). Dentro de este contexto, la mayoría de los trabajos que han evaluado esta situación a nivel internacional (revisado por Milledge, 2010), coinciden en dos puntos como requisitos esenciales para que este proceso sea competitivo:

a) El costo de producción de la biomasa debe ser menor a \$ 1.00 dólar/kg de biomasa microalgal.

b) Se deben producir simultáneamente una serie de co-productos de alto valor agregado a partir de la biomasa residual que queda después de la extracción del aceite, del tipo de los nutraceuticos, fertilizantes y metano. Esto favorece el concepto de “Biorefinería” en la que se generan varios co-productos, además del biodiesel.

Finalmente, se recomiendan los siguientes aspectos a tomar en cuenta tanto en el diseño de procesos, como en la evaluación de su factibilidad económica:

a) Utilizar datos reales resultados de la experimentación con relación al contenido de lípidos en la cepa a utilizar. Es muy común encontrar en la literatura, especialmente en la de divulgación y de mercadotecnia de empresas, cifras no realistas con relación a este parámetro.

b) No realizar proyecciones de gran escala utilizando datos de pequeña escala a nivel laboratorio. Por lo anterior, deben favorecerse los financiamientos para llegar a producción de planta piloto o de gran escala.

c) Considerar que a gran escala, los fotobiorreactores presentan numerosos problemas de operación. En contraste, los cultivos a escala comercial de las tres especies de microalgas que ya se han explotado desde hace algunas décadas *Spirulina (Arthrospira)*, *Dunaliella* y *Chlorella*, se realizan en lagunas abiertas (Borowitzka, 2006).

d) Considerar que los fotobiorreactores (FBRs), todavía no son una opción rentable de acuerdo al estudio de factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas realizado por Gao *et al.* (2009). En dicho estudio se compararon los costos de producción de la biomasa tanto en fotobiorreactores (FBRs) cerrados como en lagunas abiertas (LA) y se consideraron una serie de variables que permiten disminuir los costos de producción del biodiesel como producto final, incluso el uso del incentivo de producción de biodiesel que se ofrece en los Estados Unidos (biodiesel tax credit). La conclusión fue que la producción en FBRs cerrados, aún con consideraciones de altísimos rendimientos de biomasa (60% por arriba de los actuales reportados), una disminución del 50% en el costo de inversión y otra de 50% por reciclar el hexano utilizado durante la transesterificación, es 16.5 veces más costoso que la opción más competitiva de producción de biodiesel utilizando LA. En esta última, se consideró un 30% de aumento en la productividad de la biomasa respecto a los sistemas actuales y que el costo del CO₂ es mínimo (\$0.2 dólares/kg). En estas condiciones, el costo del galón de biodiesel en términos de equivalentes de energía fue de \$ 0.94 dólares (Tabla 3).

Tabla 3. Costo de biodiesel de microalgas en distintos escenarios, utilizando dos sistemas de producción: fotobiorreactores cerrados (FBRs) y lagunas abiertas (LA) o *raceways* (Gao *et al.*, 2009)

Tipo de sistema	Aumento del Rendimiento actual (%)	Costo del CO ₂ /kg	Costo del biodiesel algal EE ¹ \$/gal
Cerrado (50% costo de inversión, 50% recuperación de hexano)	60	n.a.	16.54
Abierto	15	n.a.	4.46
Abierto	20	n.a.	3.24
Abierto	30	n.a.	2.02
Abierto	0.0	\$0.2	2.29
Abierto	20	\$0.2	1.61
Abierto	30	\$0.2	0.94

n.a. no aplica; ¹EE: Equivalentes de Energía

6. Comentarios finales

La producción de biodiesel a partir de microalgas ha pasado por diversas etapas desde hace varias décadas. El auge académico que mostró desde los años ochentas se ha incrementado en la última década, atrayendo cada vez a un mayor número de investigadores de todo el mundo. Por otro lado, el surgimiento de numerosas compañías privadas interesadas en invertir en este nuevo tipo de bioenergético es reciente, aunque registra un crecimiento intenso y cada año existen numerosos foros y reuniones para promover la inversión en la investigación y desarrollo de este tipo de biodiesel.

Los retos científicos y tecnológicos que se requieren vencer para lograr disminuir los costos de producción de biomasa algal, así como de producción de biodiesel a costos competitivos, están relacionados a dar respuestas creativas y rentables para lograr: a) aumentar la productividad de biomasa microalgal con el mayor contenido de lípidos del perfil adecuado; b) lograr mayores rendimientos de biomasa microalgal en reactores que ofrezcan costos de inversión y de operación competitivos; c) diseñar nuevos procesos de cosecha de biomasa por medio de biofloculación o uso de cepas con capacidades intrínsecas de autofloculación; d) optimizar métodos de extracción de lípidos y de su transesterificación, que permitan mayores rendimientos a menores costos; e) diseñar nuevos procesos para la generación de co-productos de alto valor agregado.

Finalmente, aún falta mucho por recorrer en el campo de la verdadera vinculación para que los empresarios, tanto nacionales como extranjeros, inviertan en grupos de investigación de países en vías de desarrollo. El apoyo de las entidades gubernamentales más relacionadas a esta temática se hace

imprescindible para lograr que los grupos de investigación avancen en sus desarrollos y se puedan llevar a cabo evaluaciones técnico-económicas a una escala piloto o semi-industrial. También sería muy deseable que las compañías que buscan aprovechar las condiciones climáticas favorables de países en el continente americano al sur de Estados Unidos, estén dispuestas a compartir la propiedad intelectual con los investigadores latinoamericanos. Otro factor de gran importancia que debe surgir, es la generación de nuevas políticas públicas a nivel nacional e internacional para el fomento de la I & D no sólo en la producción de biodiesel, sino de biodiesel a partir de microalgas.

Agradecimientos

Maribel M. Loera-Quezada es becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT-México para realizar su Doctorado en Ciencias en el INECOL, A.C., Eugenia J. Olguín agradece el apoyo del INECOL, A.C. para realizar esta línea de investigación.

Referencias

- Adamczak, M., Bornscheuer, U.T, Bednarski, W. 2009. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol* 111(8):808-813.
- Alarco, G. 2006. Crecimiento económico y emisiones de CO₂ por combustión de energéticos en México, 2005-2030. *Economía Mexicana*, Nueva Época. Vol. XV (002) pp. 291-325.
- Asplund, M. 2008. Algal biomass growth as a step in purification of leachate. Projekt Mikrobiell Bioteknik 7.5 hp. Linköpings University, Sweden.
- ASTM Internacional. <http://www.astm.org>

- Bécares, E. 2006. Limnology of natural systems for wastewater treatment. Ten years of experiences at the experimental field for low-cost sanitation in Mansilla de las Mulas (León, Spain). *Limnetica* 25(1-2):143-154.
- Belay A. 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors - The earthrise farms experience. In: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. (Vonshak, A., ed). Taylor & Francis. London. pp.131-158.
- Ben-Amotz, A. 2009. Bio-fuel and CO₂ capture by algae. ANR meeting on «Third Generation Biofuels» - February, 5th 2009. Paris, France.
- Benemann, J.R. 2008. Microalgae biofuels - A technology roadmap. 11th International Conference on Applied Phycology. Applied phycology in the 21st century; novel opportunities in a changing world. Galway, Ireland, June 21-27.
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S., Das, K.C. 2010. *Chlorella minutissima*—a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Appl Biochem Biotechnol* 161:523-536.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiaba, S., Vonshaka, A., Cohen Z. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60(5):497-503.
- Borowitzka, M.A. 2006. Biotechnological and environmental applications of microalgae. [Online] Murdoch University, <http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAMApp10.html>
- Brierley, A.S, Kingsford, M.J. 2009. Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. *Curr Biol* 19(14):R602-R614.
- Canakci, M., Sanli, H. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(5):431-441.
- Carvalho AP; Meireles LA; Malcata FX. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog* 22(6):1490-1506.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3):294-306.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 26:126-131.
- Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Tsai, M.-T., Ong, S.-C., Chen, C.-H., Lin, C.-S. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol* 100(2):833-838
- De, B.K., Chaudhury, S., Bhattacharyya, D.K. 1999. Effect of nitrogen sources on γ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. *JAOCS* 76(1):156.
- De Moura, J.M.L.N., Campbell, K., Mahfuz, A., Jung, S., Glatz C.E., Johnson L. 2008. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybeans and Cream Demulsification. *J Am Oil Chem Soc* 85:985-995.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *J Appl Phycol* 13(4):293-299.
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambar C.K., Haak, D.C., Martin, P.R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(105):6668-6672.
- Ebi, K.L. 2008. Adaptation costs for climate change-related cases of diarrhoeal disease, malnutrition, and malaria in 2030. *Global Health* 4:9.
- Francisco, E.C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., Franco, T. T. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol* 85: 395-403.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92(5):405-416.

- Gao, Y., Gregor, Ch., Liang, Y., Tang, D., Tweed, C. 2009. Algae biodiesel. a feasibility report. *BPRO* 29000.
- Garibay Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez Saavedra, M.P., Serrano Carreón, L., Martínez Jiménez, A. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13(3):38-66.
- González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P.A., Muñoz, R. 2008. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Appl Microbiol Biotechnol* 80(5):891-898.
- Gordillo F.J.L. Goutx, M., Figueroa, F.L., Niell, F.X. 1998. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J Appl Phycol* 10(2):135-144.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269-274.
- Gouveia, L., Marques, A. E., Lopes da Silva, T., Reis, A. 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:821-826.
- Greenwell, H.C, Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface* 7(46):703-726.
- Griffiths, M.J., Harrison S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21(5):493-507.
- Grönlund, E. 2002. Microalgae at wastewater treatment in cold climate. Licentiate Thesis. Division of Sanitary Engineering. Department of Environmental Engineering, Luleå University of Technology, SE-971 87, Luleå, Sweden.
- Groom, M.J., Gray, E.M., Townsend, P.A. 2008. Biofuels and biodiversity: principles for creating better policies for biofuel production. *Conserv Biol* 22(3):602-609.
- Harmenlen, T., Oonk, H. 2006. Microalgae biofixation processes: applications and potential contributions to greenhouse gas mitigation options. Report order no. 36562. International network on biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae operated under the International Agency Greenhouse Gas R&D Programme. Sponsored by EniTecnologie, S.p.A., San Donato Milanese, Milan, Italy. pp. 45.
- Hernández, E. Olguín, E.J. 2002. Biosorption of heavy metals influenced by the chemical composition of *Spirulina* biomass. *Environ Technol* 23:1369-1377.
- Hoshida, H., Ohira, T., Minematsu, A., Akada, R., Nishizawa, Y. 2005. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J Appl Phycol* 17(1):29-34.
- Hu, Q., Sommerfeld, M. 2004. Selection of high performance microalgae for biorremediation of nitrate-contaminated groundwater. Technical report for grant number 01-HO-GR-0113. School of Life Sciences, Arizona State University. March 1, 2003 to February 28, 2004. pp. 13.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, Darzins, A.I. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54(4):621-639.
- Huntley, M.E., Redalje, D.G. 2007. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 12(4): 573-608.
- IPCC, 2002. Cambio climático y biodiversidad. Documento técnico V del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Gitay, H., Suárez, A., Dokken, D.J. Watson, R. (eds). 93 pp.
- IPCC, 2005. IPCC Special report on carbon dioxide capture and storage. Prepared by Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Metz, B., Davidson, O., de Coninck, H.C., Loos, M., Meyer, (eds.)]. Cambridge University Press,

- Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 442 pp.
- IPCC, 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K., Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 pp.
- Jain, R. 2008. Global climate change: impacts and policy options. *Clean Techn Environ Policy* 10(1):1-5.
- Johnson, M.B., Wen, Z. 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:525-534.
- Khotimchenko, S.V., Yakovleva, I.M. 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66(1):73-79.
- Khozin-Goldberg, I; Bigogno, C; Shrestha, P; Cohen, Z. 2002. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (*Trebuxiophyceae*). *J Phycol* 38(5):991-994.
- Kirilenko, A.P., Sedjo, R.A. 2007. Climate change impacts on forestry. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(50):19697-19702.
- Larsdotter, K. 2006. Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a nordic climate. A doctoral thesis from the School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden. pp. 44.
- Lee, A.K, Lewis, D.M., Ashman, P.J. 2009. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J Appl Phycol* 21:559-567.
- Li, Y., Qin, J.G. 2005. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *J Appl Phycol* 17(6):551-556.
- Li, Q., Du, W., Liu, D. 2008a. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:749-756.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Doboiscalero, N. 2008b. Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog* 24(4):815-820.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. 2008c. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4):629-636.
- Li, X., Hu, H-Y., Yang, J. 2010. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnol* 27(1)59-63.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol* 99(11):4717-4722.
- Ma, J. 2009. Microalgae for biodiesel, CO₂ capture and wastewater treatment. UNLV Renewable Energy Symposium.
- Majer, S., Mueller-Langer, F., Zeller, V., Kaltschmitt, M. 2009. Implications of biodiesel production and utilization on global climate - a literature review. *Eur J Lipid Sci Technol* 111(8):747-762.
- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biomaterials* 15(4):377-390.
- Mandal, S., Mallick, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 84(2):281-291.
- Mata, T.M., Martins A.A., Caetano N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14:217-232.
- Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R., Tanaka, T. 2009. Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024 toward

- biofuel production. *Biotechnol Lett* 31:1367-1372.
- Mazzuca-Sobczuka, T., Chisti, Y. 2010. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J Chem Technol Biotechnol* 85:100-108.
- Mendoza, H., Molina Cedres, C., de la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K., Carmona, L. 2008. Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas Aceites* 59(1):27-32.
- Milledge, J.J. 2010. The challenge of algal fuel: economic processing of the entire algal biomass. *Materials Engineering Newsletter* 1(6):4-5.
- Muñoz, R. Guieysse, B. 2006. Algal-bacteria processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res* 40:2799-2815.
- Molina Grima, E., Acién Fernández, F.G., García Camacho, F., Chisti, Y. 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol* 70(1-3):231-247.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Acién Fernández, F.G. Robles Medina, A., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv* 20:491-515.
- Morton, J.F. 2007. The impact of climate change on smallholder and subsistence agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(50):19680-19685.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández, E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technol* 77(1):19-24.
- Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol Adv* 22(1-2):81-91.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Pérez, T. 2003. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J Appl Phycol* 15(2-3): 249-257.
- Phang, S.M., Miah, M.S., Yeoh, B.G., Hashim, M.A. 2000. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *J Appl Phycol* 12(3-5):395-400.
- Pienkos, P.T, Darzins, A. 2009. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels Bioprod Bioref* 3:431-440.
- Powell, N., Shilton, A.N., Pratt, S., Chisti, Y. 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorous by microalgae in waste stabilization ponds. *Environ Sci Technol* 42(16):5958-5962.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, MC. 2010. Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryotic Cell* 9 (4): 486-501.
- Rivera, I., Villanueva, G., Sandoval, G. 2009. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. *Grasas Aceites* 60(5):469-474.
- Rodolfi, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102(1):100-112.
- Rosenberg, J.N., Oylerl, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol* 19(5):430-436.
- Rutz, D., Janssen, R. 2008. Biofuel technology handbook. WIP Renewable Energies. Project report Biofuel Marketplace 2nd version. 152p.
- Ryan, C. 2009. Cultivating clean energy. The promise of algae biofuels. This report was carried out from July 2008 to June 2009 for the Natural Resources Defense Council (NRDC) under the sponsorship of the Gordon and Betty Moore Foundation (Palo Alto, CA). Preparation was supervised by NRDC and Terrapin Bright Green and conducted with the advice and assistance of the NRDC Algae Biofuels Advisory Committee.

- Samori, C., Torri, C., Samori, G., Fabbri, D., Galletti, P., Guerrini, F., Pistocchi, R., Tagliavini, E. 2010. Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource Technol* 101(9): 3274-3279.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephen, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res* 1(1):20-43.
- Shales, S. 2007. Biodiesel: a microbiologist's perspective. *Microbiologist* June 26-29.
- Sheehan J, Dunahay, Benemann, T. J, Roessler, P. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. Close-out report. National Renewable Energy Lab, Department of Energy, Golden, Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190, dated July 1998.
- Shifrin, N., Chisholm. S. 1980. Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications. In: (Shelef, G., Soeder, C. eds.) *Algal Biomass* Elsevier, Amsterdam, pp. 627-645.
- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol* 20(3):245-251.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101(2):87-96.
- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., Yoshida, T. 2000. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(1):112-117.
- Takagi, M., Karseno, S., Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101(3):223-226.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien S., Burris, N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Tech* 5(6):435-440.
- Tran, H.L., Hong, S.J., Lee C.G. 2009. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from *Botryococcus braunii* LB 572 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Bioproc E* 14:187-192.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J Renew Sust Energ* 2: 012701-012715.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technol* 99(10):4021-4028.
- Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. 2009. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-009-9488-8.
- Vasudevan, P.T., Briggs, M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(5):421-430.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 79(5):707-718.
- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju Y.H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J Taiwan Inst Chem E* 40(1):13-20.
- Wogan, D.M., Da Silva, A.K., Webber, M.E., Stautberg, E. 2008. Algae: pond powered biofuels. ATI Cleanenergy Incubator. The University of Texas at Austin. pp. 23.
- WWF. 2004. Living planet report. World Wide Fund for Nature (World Wildlife Fund). Loh, J., Wackernagel, M. (eds). Gland, Switzerland.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(1):29-36.