

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL”**

Realizado por:

LUIS FERNANDO GUASUMBA ANCHUNDIA

Director del proyecto:

PhD (c) Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 04 de febrero del 2022

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, LUIS FERNANDO GUASUMBA ANCHUNDIA, con cédula de identidad #1726201708, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1726201708

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL”**

Realizado por:

LUIS FERNANDO GUASUMBA ANCHUNDIA

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Medrano Barboza', is enclosed in a light blue rectangular box.

FIRMA

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

PhD. JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

PhD. ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 04 de febrero del 2022

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de

Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Energías Renovables

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada para:

La persona más importante en mi vida que es Dios y resaltar que es él quien me ha dado la sabiduría y la inteligencia para llegar a ser la persona quien soy y al lugar donde estoy, quien con su amor y paciencia me ha guiado por el transcurso de todos mis estudios hasta alcanzar el galardón deseado de la graduación.

A la Dra. María Luisa Piraquive quien me ha enseñado que para los estudios no hay edad y que, aunque estemos pasando momentos difíciles en nuestros estudios basta con buscar ayudar y apoyarse en Dios para que nos saque adelante, al Lic. Miguel Ángel Arroyave, Lic. Gustavo Gaona y Lic. Luis Guajardo quienes me han motivado a seguir y continuar con mis estudios con su guía, sus consejos, enseñanzas, orientaciones y ejemplos.

A todo mi vincula familiar quienes estuvieron apoyándome en todo el proceso de mis estudios, a mis padres Luis Alberto Guasumba y Rosaura Anchundia quienes me ayudaron económicamente en mis estudios además de su amor, comprensión y guía para continuar con mis estudios.

A mi hermano Stiven Guasumba quien me ha ayudado en el transcurso de mis estudios enseñándome con paciencia y con su ejemplo ayudando a que todo sea más fácil. A mis amigos Javier Oleas, Alisson Vega y Samuel Arroyo quienes me apoyaron en el transcurso del proyecto con cariño y paciencia dando motivación haciendo que el proceso de estudios no sea tan difícil.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que fueron instrumentos para mi ayuda en este proyecto, los profesores Johanna Medrano, José Rubén y Alberto Aguirre quienes me guiaron en todo el proceso los cuales sin sus opiniones, consejos, tolerancia y paciencia no hubiera llegado hasta donde estoy agradezco por sacar tiempo para ayudarme. Quiero hacer énfasis en la Dra. Johanna Medrano quien con su colaboración permitió el progreso de esta tesis.

Agradecer a todo el personal docente y autoridades de la universidad quienes han estado en mi proceso de aprendizaje y me han llenado de todo el conocimiento que han podida dar para llegar a ser un profesional exitoso en mi vida y me han enseñado a seguir continuando con mis estudios mostrándome que siempre hay algo nuevo que aprender.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

Para someter a:

To be submitted:

**Luis Fernando Guasumba Anchundia¹, Johanna Medrano Barboza^{1*}, José Rubén
Ramírez Iglesias, Alberto Alejandro Aguirre Bravo, Lino Arisqueta Herranz**

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL”**

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador. 04/02/2022

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD (c) Johanna Medrano Barboza,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: 0969094576; email: johanna.medrano@uisek.edu.ec

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

RESUMEN

Las microalgas son organismos capaces de crecer en ambientes acuáticos diversos incluyendo aguas residuales, ya que pueden degradar sus nutrientes para su biorremediación, además de realizar fotosíntesis y acumular una gran cantidad de biomasa que contiene lípidos de alta energía, usados para la producción de biocombustibles. En el presente estudio se usaron las especies *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* cultivadas en agua residual del proceso de elaboración de cerveza artesanal en fotobiorreactores planos, bajo las condiciones atmosféricas de Quito con control de temperatura. Para las dos especies se analizó el crecimiento (conteo celular y densidad óptica), los parámetros fisicoquímicos (NT, COT y PT) y extracción de lípidos, los cuales se caracterizaron en forma de ácidos grasos libres (AGL) y ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) para su uso potencial como biocombustible. Los resultados indican similares producciones de biomasa en las especies *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* (0.028 y 0.027 g/L*d respectivamente), altos porcentajes de remoción de nutrientes en *Scenedesmus sp* (75.82 % NT, 71.66 % PT y 78.08 % COT) y en *Chlorella vulgaris* (60.31% NT, 78.06 % PT, 52.77 % COT). Los tres mejores solventes extractores en lípidos y AGL fueron etanol, metanol y cloroformo: metanol (1:2), con rangos de extracción de en 11.11 – 19.07 % m/m para lípidos y 7.51 – 41.68 % m/m para AGL. Para *Chlorella vulgaris* se obtuvieron mejores porcentajes de extracción en FAMEs usando H₂SO₄ con un rango entre 38.15 - 45.50 % m/m; mientras que para *Scenedesmus sp* su mejor extracción fue usando resina comercial CT-269 con un rango entre 30 – 70 % m/m. Aunque los valores de lípidos, AGL y FAMEs son bajos comparado con estudios de otros autores, no se descarta el posible uso del agua residual de cerveza para la obtención de biocombustibles a partir del cultivo de estas dos especies.

Palabras claves: agua residual, cervecería, *Scenedesmus sp*, *Chlorella vulgaris*, lípidos, AGL, FAMEs.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

SUMMARY

Microalgae are organisms capable of growing in diverse aquatic environments including wastewater, since they can degrade their nutrients for bioremediation, as well as photosynthesize and accumulate a large amount of biomass containing high-energy lipids, used for biofuel production. In the present study, *Scenedesmus sp* and *Chlorella vulgaris* species were used, grown in wastewater from the craft beer brewing process in flat photobioreactors, under the atmospheric conditions of Quito with temperature control. For both species, growth (cell count and optical density), physicochemical parameters (NT, TOC and PT) and lipid extraction were analyzed, which were characterized in the form of free fatty acids (FFA) and fatty acid methyl esters (FAMES) for their potential use as biofuel. The results indicate similar biomass productions in *Scenedesmus sp* and *Chlorella vulgaris* species (0.028 and 0.027 g/L*d respectively), high nutrient removal percentages in *Scenedesmus sp* (75.82 % NT, 71.66 % PT and 78.08 % TOC) and in *Chlorella vulgaris* (60.31 % NT, 78.06 % PT, 52.77 % TOC). The three best extracting solvents in lipids and FFA were ethanol, methanol and chloroform: methanol (1:2), with extraction ranges of 11.11 - 19.07 % m/m for lipids and 7.51 - 41.68 % m/m for FFA. For *Chlorella vulgaris* better extraction percentages were obtained in FAMES using H₂SO₄ with a range between 38.15 - 45.50 % m/m; while for *Scenedesmus sp* its best extraction was using commercial resin CT-269 with a range between 30 - 70 % m/m. Although the values of lipids, FFA and FAMES are low compared to studies by other authors, the possible use of beer wastewater to obtain biofuels from the cultivation of these two species is not ruled out.

Key words: wastewater, brewery, *Scenedesmus sp*, *Chlorella vulgaris*, lipids, FFA, FAMES.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

1. INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles son combustibles que se obtienen a partir de la biomasa de organismos vivos o sus desechos metabólicos. Estos se clasifican en tres grupos: los de primera generación (G1) producidos a partir de cultivos alimentarios o alimentos de animales, los de segunda generación (G2) que se obtienen de materias primas no alimentarias, residuos agrícolas y forestales, por último los de tercera generación (G3) que se extraen de las algas; entre ellas, las microalgas que tienen la biomasa más abundante en el mundo (Chang & Murillo, 2017). La ventaja con respecto a las otras generaciones es su crecimiento rápido, evita la competencia alimentaria y el uso de tierras destinadas a cultivos alimentarios, ya que pueden cultivarse en tierras no cultivables y empleando aguas residuales, pero hay desventajas como el alto consumo de energía, lo cual hasta ahora hace su obtención económicamente inviable (Jeswani et al., 2020).

El crecimiento de microalgas en agua residual de cerveza se ha descrito como un proceso eficiente, rentable y sostenible para la remediación de aguas de descarga, ya que tiene un alto contenido de nitrógeno, fósforo, carbono y otras cargas orgánicas que pueden aprovecharse para obtener biomasa para la producción de biocombustibles, bioplásticos y biofertilizantes (Ferreira et al., 2018). Los beneficios de cultivar en agua residual son: la reducción de costos en la producción de biomasa, menor demanda de energía, y optimización de la metodología de productividad y cosecha. (Navarro-López et al., 2020). El agua residual de cerveza tiene las siguientes características: altos componentes orgánicos como azúcares, almidón, etanol y ácidos grasos volátiles, su temperatura oscila entre 25-38 °C y pH variable entre 3-12, dependiendo de su pretratamiento. Con estas características las microalgas no tienen ningún problema en cultivarse en este tipo de agua residual (Amenorfenyo et al., 2019).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Los biocombustibles derivados de biomasa como las microalgas, surgen de la idea de reemplazar los combustibles fósiles debido a la preocupación por el cambio climático, la disminución de recursos fósiles y el aseguramiento de la sostenibilidad energética (Ramos & Villar, 2016). Se perciben como combustibles amigables con el ambiente, ya que su uso disminuye la concentración de contaminantes como el dióxido de carbono (CO₂) en el aire puesto que en la combustión de biocombustibles se emite la misma cantidad de CO₂ captada por las microalgas durante su crecimiento (Chang & Murillo, 2017). La idea de obtener biocombustible a partir de aceite vegetal surgió en Paris en el siglo XIX, Rudolph Diesel usó aceite no procesado de origen vegetal para mantenimiento de motores, pero obtuvo algunos problemas, de allí el pensamiento de que el aceite sea procesado para obtención de biocombustibles, y de esta manera sea similar a los combustibles fósiles en su capacidad térmica y su perfil de emisión (Ramírez & Chávez Norma, 2012). Algunos estudios demuestran que la mezcla de aceite de algas con combustible fósil en una proporción del 20% reduce el escape de hidrocarburos; es por ello que los biocombustibles se consideran una alternativa a los combustibles derivados del petróleo y el carbón (Ganesan et al., 2020).

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos que crecen en ambientes acuáticos y pueden ser eucariotas o procariotas, igual que las cianobacterias. Para su cultivo hay que considerar las condiciones óptimas para su crecimiento, tales como: macronutrientes (fósforo, nitrógeno y carbono), micronutrientes, temperatura entre 20-30°C y el pH entre 6-8.76; además de tomar en cuenta la salinidad, intensidad lumínica, agitación y alimentación de O₂ y CO₂ (Vélez Tamayo, 2012). Algunas especies pueden resistir y/o adaptarse a altos valores de temperatura, pH, y salinidad. (Khan et al., 2018). Pero para obtener un mejor rendimiento de lípidos de las microalgas, se someten a condiciones de estrés limitando el nitrógeno y aumentando el hierro en el medio (Serrano Bermúdez et al., 2011). Debido a su tasa de crecimiento rápido, producción de biomasa, su aportación de carbono, lípidos, proteínas,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

antioxidantes, entre otros bioproductos; son consideradas como una de las mejores biomásas para la producción de biocombustibles, suplementos de salud, productos farmacéuticos y cosméticos (Khan et al., 2018).

Los biocombustibles pueden obtenerse a partir de microalgas, debido a que estas son capaces de convertir el CO₂ y la luz en biomasa que contiene lípidos de alta energía que son el pilar fundamental de biocombustibles líquidos como biodiésel y bioaceites. Los lípidos que se producen se dividen en lípidos polares glicerofosfolípidos (estructura celular) y lípidos no polares triacilgliceroles (almacenamiento de energía). Los lípidos polares tienen largas cadenas de ácidos grasos que se transforman en ácidos grasos polinsaturados con potencial para producir biocombustibles. (Alishah Aratboni et al., 2019). Para la extracción de estos lípidos de la biomasa microalgal se han desarrollado varias técnicas mecánicas, químicas y enzimáticas. En la extracción química, se utilizan diferentes disolventes orgánicos y catalizadores para extracción de éster de metilo de ácidos grasos (FAMEs por sus siglas en inglés), por medio de reacciones de transesterificación en biomasa seca y húmeda. Pero también después de todos estos procesos se puede recuperar la biomasa residual para producir biogás y licores para uso de fertilizantes (Musa et al., 2019).

La biosíntesis de lípidos empieza con la unión del complejo luz-biomasa medida por la clorofila, quienes capturan energía en forma de fotones y que son empleados en la oxidación catalítica del agua para formar electrones, protones y O₂. Los electrones promueven la producción de NADPH, mientras que los protones generan un gradiente electroquímico para formación de ATP, estos dos compuestos son usados en el ciclo de Calvin para formar acetil-CoA, las cuales son carboxiladas en el cloroplasto formando malonil-CoA, quien es transportada a la ACP (proteína portadora de acilos) y es condensada con otra molécula de malonil-CoA. Este ciclo se repite hasta formar cadenas saturadas de ácidos grasos (Scott et al., 2010).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Los triglicéridos (TAG) se forman en los plásmicos del retículo endoplasmático donde se producen lípidos neutros. La síntesis de TAG empieza con la condensación de glicerol-3-fosfato con acil-CoA formando ácido lisofosfatídico, el cual es condensado con otra molécula de acil-CoA para producción de ácido fosfatídico; esta molécula es desfosforilada por enzimas formando diacilglicerol, al cual se une otro grupo de acil-CoA formando TAG, los cuales son la materia prima para la obtención de biocombustibles (Carlos Fernández-Linares et al., 2012).

2. HIPÓTESIS

El agua residual de cerveza tiene un alto contenido de nutrientes que pueden aprovecharse como medio de cultivo para que microalgas de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* tengan una mayor tasa de crecimiento y un alto porcentaje de lípidos.

3. OBJETIVOS

General.

Obtener un alto rendimiento de lípidos a partir de microalgas cultivadas en agua residual de una industria de cerveza artesanal como materia prima potencial para la producción de biocombustibles.

Específicos.

Caracterizar el agua residual de cerveza artesanal mediante métodos fisicoquímicos para su uso como potencial medio de cultivo para las microalgas de estudio.

Determinar la cinética de crecimiento, parámetros fisicoquímicos y productividad de biomasa de microalgas cultivadas en el agua residual de cerveza artesanal en fotobiorreactores expuestos a las condiciones atmosféricas de la ciudad de Quito.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Obtener un rendimiento de lípidos, ácidos grasos libres y ésteres metílicos aptos para la producción de biocombustibles a partir de microalgas cultivadas en agua residual de una industria de cerveza artesanal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio.

El estudio se realizó en Ecuador en la región sierra en la ciudad de Quito en el laboratorio de Química de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK que se encuentra ubicado en la avenida Einstein y quinta transversal. La recolección del agua residual se realizó en las instalaciones de una cervecería ubicada en Cumbayá, Ecuador.

Materiales.

- Inóculo de microalgas.
- Agua residual de cerveza artesanal.
- Reactivos y equipos.

Metodología.

Fase de campo.

- **Obtención del inóculo.**

Las cepas de microalgas de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* que se utilizaron en este estudio se obtuvieron del Banco Español de Algas y se conservaron en medio líquido BBM (Bold's Basal Medium) que aporta los nutrientes necesarios para su crecimiento óptimo (Sharma et al., 2016).

- **Obtención del medio de cultivo.**

Para el estudio se recolectaron 100 l de agua residual de cerveza de una fábrica de cerveza artesanal ubicada en Quito, Ecuador en el sector de Cumbayá.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Fase de laboratorio.

- **Preparación del inóculo.**

Previamente a la siembra en el fotobiorreactor con agua residual de cerveza se realizaron cinco réplicas de cada una de las cepas en medio BBM (Bold's Basal Medium) en botellas autoclavables de 1 l con una dilución 1:10 dentro de una campana de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación; a continuación, se colocó una conexión de aireación continua de 4.2 l/min durante 15 días a temperatura ambiente, con luz artificial constante, con fotoperiodos de 12 horas a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

- **Preparación del medio de cultivo.**

Se prepararon 80 l del agua residual recolectada a una dilución 1:10 para *Chlorella vulgaris* y dilución 1:20 para *Scenedesmus sp*, luego se esterilizó en autoclave a $121.5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, los restos de partículas sólidas se removieron con un filtro de multicapas de forma análoga a las investigaciones de (Qin et al., 2014; Wang et al., 2015).

- **Siembra en el fotobiorreactor.**

El inóculo de microalgas con densidad celular de $2.1 \cdot 10^5$ cel/ml para *Scenedesmus sp* y $4.98 \cdot 10^6$ cel/ml para *Chlorella vulgaris* se cultivaron a razón de 40 L de agua residual previamente tratada y filtrada con dilución 1:20 para *S. sp* y 1:10 para *C. vulgaris* en fotobiorreactores con control de temperatura $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y aireación constante durante 14 días sin reposición de nutrientes. El fotobiorreactor se mantuvo expuesto en la intemperie a condiciones ambientales de Quito durante el mes de agosto del 2021.

- **Determinación de crecimiento microalgal.**

Se recolectaron 350 ml de muestras diarias de los fotobiorreactores de cada especie durante 14 días; el crecimiento de los cultivos de microalgas se determinó mediante conteo celular, densidad óptica y peso seco. Para el conteo celular se realizó un recuento de células en

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

cámara de Neubauer para ser visualizadas a continuación en un microscopio óptico marca Leica a 20X y se determinó su número de células totales diarias mediante el protocolo y la Ec (1) (Bastidas, 2011). Para la densidad óptica se utilizó un espectrofotómetro marca HACH DR5000 y se realizó a 680 nm según el método de turbidez. (Morales et al., 2019). Con relación al peso seco se usaron filtros de papel para el análisis cuantitativo con un secado de 60 °C por 24 h similares a la investigación de (Chia et al., 2013). La productividad total se determinó con la Ec (2) con la suma de la biomasa seca y humedad como la total en gramos relacionada con el volumen total del cultivo en ml y el tiempo de cultivo en días.

$$\text{Concentración de células} = (\# \text{ de células} * 10000) / (\# \text{ de cuadros} * \text{dilución}) \text{ cel/ml} \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Productividad total} = (\text{biomasa total}) / (\text{volumen} * \text{tiempo}) \text{ g/l*d} \quad \text{Ec. (2)}$$

- **Determinación de parámetros fisicoquímicos (NT, COT, PT).**

Las muestras que se recolectadas diariamente se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min; a continuación, se recolectó el sobrenadante para hacer los respectivos análisis de los parámetros fisicoquímicos del cultivo por duplicado. La determinación de los nutrientes carbono total COT (mg/l C), nitrógeno total NT (mg/l N) y fósforo total PT (mg/l PO₄³⁻) se realizó utilizando kits y protocolos estandarizados HACH 10128 (HACH, 2014), HACH 1072 (HACH, 2014) y 10127 (HACH, 2014), respectivamente. Con los sobrenadantes anteriormente centrifugados se procedió a realizar la medición de su pH por cada día.

- **Recolección de cultivo y obtención de biomasa.**

Transcurrido el tiempo de cultivo para la producción de biomasa, cuando alcanzó su fase estacionaria según las mediciones de su densidad óptica, se recolectó el cultivo del

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

fotobiorreactor y se a continuación de procedió a centrifugar el contenido a 4000 rpm por 5 min en tubos falcón de 50 ml con un volumen de 35 ml para obtener recuperación de biomasa según las técnicas de recolección de (Singh & Patidar, 2018). Obtenida la biomasa húmeda se procedió a conservar en tubos falcón de 50 ml en refrigeración de -4°C, tal como indica el método de Ynga Huamán (2011) y el sobrante de biomasa húmeda se trasvasó a cajas Petri y se secaron en una estufa marca WiseVen WOF105 a °60 durante 24 h para obtener biomasa seca.

- **Extracción de lípidos.**

Para la extracción de lípidos totales se usó la biomasa húmeda y seca obtenida anteriormente, se extrajeron los lípidos de estos por medio de ultrasonido y con seis solventes orgánicos de alta pureza (grado HPLC) que fueron etanol, acetato de etilo, metilciclohexano, hexano, metanol y cloroformo: metanol (1:2), análogamente a los métodos de (Hadrich et al., 2018) y (Salazar Pérez, 2012). El porcentaje de rendimiento de lípidos obtenidos se determinó mediante la Ec (3) donde, Wl es la diferencia entre el peso del tubo recolector con los lípidos extraídos (g) y el peso del tubo recolector vacío (g) y Wa es el peso de la biomasa microalgal seca o húmeda (g) utilizada para la extracción. Para la productividad total de lípidos se utilizó la Ec (4) donde Ml es la masa de lípidos secos (g), V es el volumen del cultivo (l) y t es el tiempo de cultivo (d).

$$\% \text{ Lípidos} = (Wl / Wa) * 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\text{Productividad total} = Ml / (V * t) \text{ g/l*d} \quad \text{Ec. (4)}$$

- **Extracción de ácidos grasos libre (AGL).**

Los ácidos grasos libres se obtuvieron por medio de la saponificación de la biomasa seca microalgal con los mismos seis solventes orgánicos descritos anteriormente e hidróxido de potasio (KOH) en un baño térmico de 60°C por 4 h a 700 rpm según el protocolo de extracción

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

de AGL de Dejoye Tanzi et al., (2013). El porcentaje de rendimiento de extracción de AGL se expresó mediante la Ec (5) donde W_{agl} es la diferencia del peso del tubo recolector con la extracción de AGL (g) y el peso del tubo recolector vacío (g) y W_a es el peso de la biomasa microalgal seca utilizada (g).

$$\% \text{ AGL} = (W_{agl} / W_a) * 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

- **Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (Fatty acid methyl esthers -FAMES).**

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) que se encuentran presentes en la biomasa seca microalgal se extrajeron por medio de tres procesos:

1. Proceso directo: por medio de la biomasa seca obtenida anteriormente y utilizando dos catalizadores diferentes.
2. Proceso indirecto: por medio de lípidos obtenidos anteriormente de la biomasa seca y húmeda y utilizando dos catalizadores diferentes.
3. Proceso con AGL: por medio de sus ácidos grasos libres obtenidos anteriormente y utilizando dos catalizadores diferentes.

Para la extracción de FAMES en los tres procesos se utilizaron el ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalizador ácido homogéneo y la resina comercial CT-269DR como catalizador ácido heterogéneo, además del solvente metanol. El procedimiento de los tres procesos se realizó por duplicado para el catalizador homogéneo colocando catalizador, solvente y biomasa dentro de reactores de vidrio en relación (1,74:30:1), respectivamente; mientras que para el catalizador heterogéneo se colocaron catalizador, solvente y biomasa en una relación (1,1:100:1). Los reactores se colocaron en baño térmico a $90^\circ C$ por 4 horas a 900 rpm. Concluida la reacción, se procedió a filtrar en un equipo Millipore, al filtrado se le agregaron 5 ml de agua Mili-Q para lavarlo y 2 ml de la mezcla Hexano: dietileter (80:20) para eliminar

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

impurezas, trazas de catalizador y del solvente; a continuación, se trasvasó a embudos de decantación y se dejó reposar por 10 min obteniendo separación de fases, después se recolectó la fase orgánica en tubos pequeños previamente pesados y se dejó secar en una estufa a 60° C por 24 h (César Narváez Rincón et al., 2004) (Sánchez-Bayo et al., 2020). Los resultados se expresaron mediante la Ec (6) donde W_f es la diferencia del tubo peso del tubo recolector con la extracción de FAMES (g) y el peso del tubo recolector vacío (g) y W_x es el peso de la biomasa o grasa utilizada según el proceso (g).

$$\% \text{ FAMES} = (W_f / W_x) * 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

- **Análisis estadístico de los datos.**

Los datos obtenidos de los análisis de concentración celular, peso seco, densidad óptica, pH, remoción de nutrientes (NT, PT y COT), porcentaje de lípidos, AGL y FAME se hicieron por duplicado las cuales fueron replicas técnicas y se realizó las comparaciones de sus medias a través de la prueba Kruskal Wallis con el programa Statgraphics versión 18 y se expresaron con valores de desviación estándar ($X \pm DE$). Las diferencias entre medias significativas se dan cuando ($p < 0,05$)

5. RESULTADOS

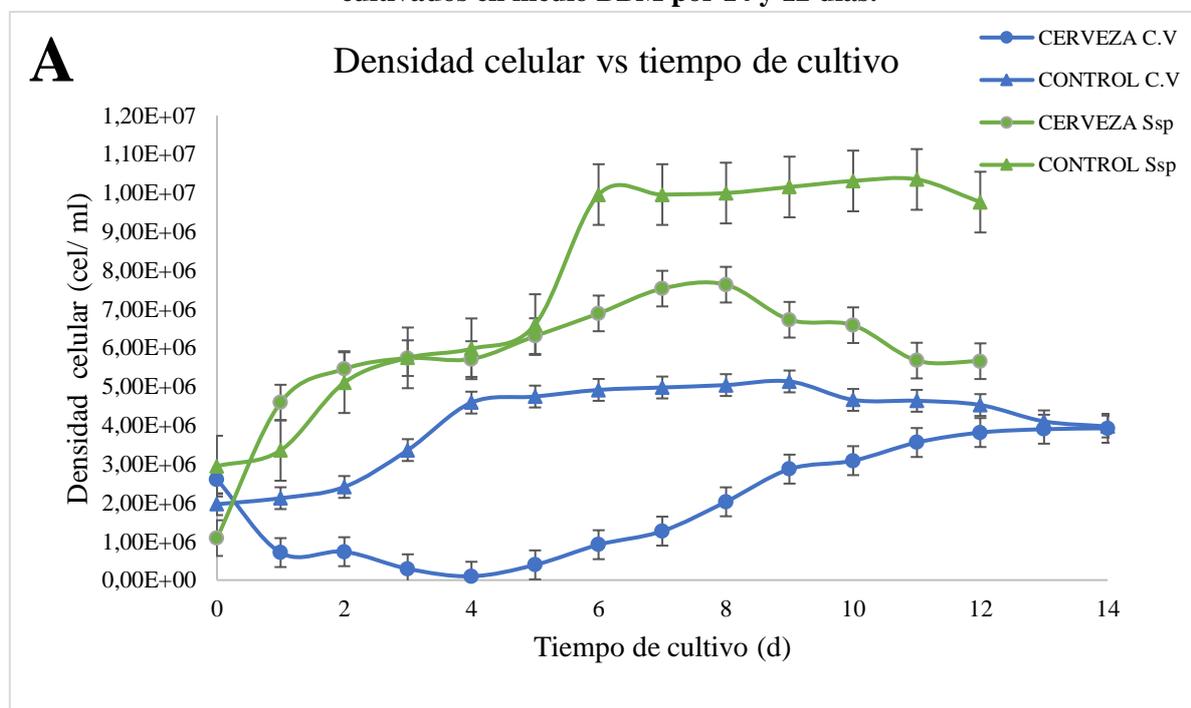
- **Densidad celular.**

En la figura A se aprecia la comparación de las curvas de crecimiento de células por día de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza artesanal por un periodo de 14 y 12 días, respectivamente; además de sus cultivos controles en medio BBM. En la figura se puede observar que para la especie *Chlorella vulgaris* los valores de concentración de células diarias inicial fueron $2.6 * 10^6 \pm 5.25 * 10^4$ cel/ml, obteniendo un valor final de $3.92 * 10^6 \pm 1.77 * 10^5$ cel/ml; mientras que su control alcanzó valores de $1.96 * 10^6 \pm 1.10 * 10^4$ cel/ml y $3.97 * 10^6 \pm 6.63 * 10^4$ cel/ml. En cambio, para la especie *Scenedesmus sp* se

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

percibe el crecimiento de células por día teniendo como valor inicial $1.09 \cdot 10^6 \pm 1.22 \cdot 10^5$ cel/ml y final de $5.66 \cdot 10^6 \pm 6.63 \cdot 10^4$ cel/ml, mientras que su control tuvo valores de $2.95 \cdot 10^6 \pm 3.31 \cdot 10^4$ cel/ml y $9.77 \cdot 10^6 \pm 8.84 \cdot 10^4$ cel/ml, respectivamente.

Figura A: Densidad celular en (cel/ml) vs tiempo de cultivo (d) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza artesanal con sus respectivos controles cultivados en medio BBM por 14 y 12 días.



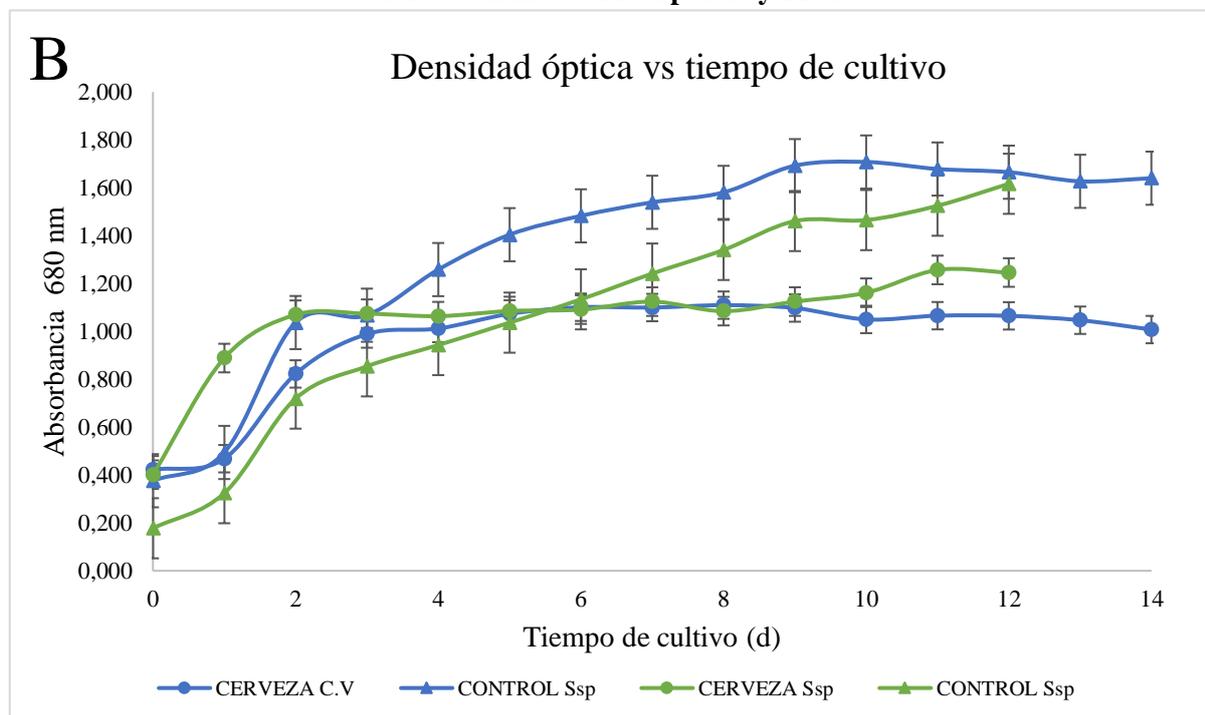
- **Densidad óptica.**

En la figura B se detallan las curvas de absorbancia a 680 nm de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza artesanal por un periodo de 14 y 12 días con sus respectivos controles cultivadas en medio BBM. Para la especie *Chlorella vulgaris* se ve un valor inicial de absorbancia de 0.422 ± 0.0006 y un valor final de 1.008 ± 0.003 , mientras que su control obtuvo valores de 0.376 ± 0.017 y 1.640 ± 0.014 , respectivamente. Para la siguiente especie se aprecia un valor de absorbancia inicial de 0.402 ± 0.011 y un valor final de 1.246 ± 0.005 , mientras que su control tiene valores de 0.178 ± 0.002

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

y 1.617 ± 0.004 . El valor del agua residual de cerveza previo al cultivo de microalgas fue de 0.0363 ± 0.002 .

Figura B: Absorbancia a una longitud de onda de 680 nm vs tiempo de cultivo (d) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.

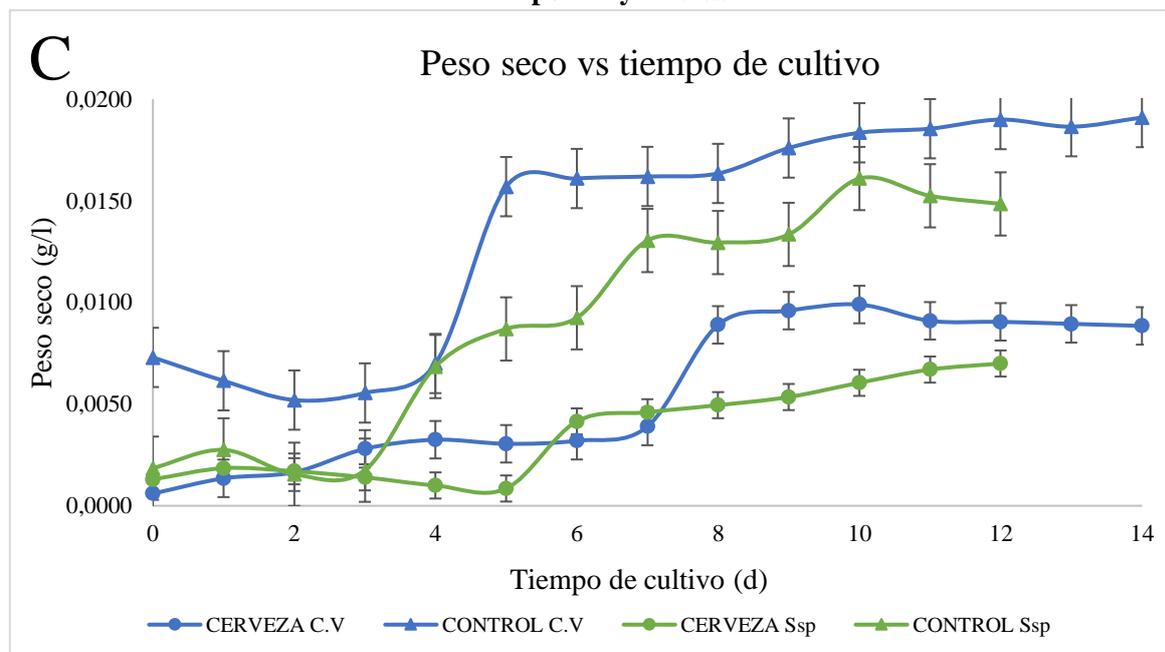


- **Peso seco.**

En la figura C se describe la curva de peso seco de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza durante 14 y 12 días para cada uno además de sus respectivos controles en medio BBM. Para la especie *Chlorella vulgaris* se observa que su valor inicial es $0.0006 \pm 1.57 \cdot 10^{-16}$ g/ml y 0.00885 ± 0.0011 g/ml como valor final, mientras que su control tiene un valor inicial de 0.0073 ± 0.0009 g/ml y 0.0191 ± 0.0004 g/ml. Para la siguiente especie *Scenedesmus sp* se presenta un valor inicial de peso seco de 0.0013 ± 0.0001 g/ml y 0.007 ± 0.0001 g/ml como valor final mientras que su control obtuvo valores de 0.00185 ± 0.0005 g/ml y 0.01485 ± 0.0046 g/ml, respectivamente.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Figura C: Peso seco en (g/ml) vs tiempo de cultivo (d) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.



En la tabla 1 se observa la biomasa total de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* obtenida a partir de los 40 l del cultivo en agua residual de cerveza y en medio BBM como control, además de sus productividades totales.

Tabla 1: Biomasa (g) y productividad (g/l*d) total obtenida las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días en un volumen de 40 l.

Medio de cultivo	Especies	Biomasa total (g)	Volumen (l)	Tiempo (d)	Productividad total (g/l*d)
Cerveza	<i>Scenedesmus sp</i>	13,403	40	12	0,028
	<i>Chlorella vulgaris</i>	15,267	40	14	0,027
BBM	<i>Scenedesmus sp</i>	22,286	40	12	0,046
	<i>Chlorella vulgaris</i>	18,340	40	14	0,033

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

- **Remoción de nutrientes.**

En la tabla 2 se reflejan los parámetros fisicoquímicos analizados del cultivo de agua residual de cerveza antes y después de ser inoculadas con las especies de estudio y el porcentaje de remoción de nutriente respectivo luego de la cosecha del cultivo en términos de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT). Previo a la inoculación para *Scenedesmus* fueron los siguientes:

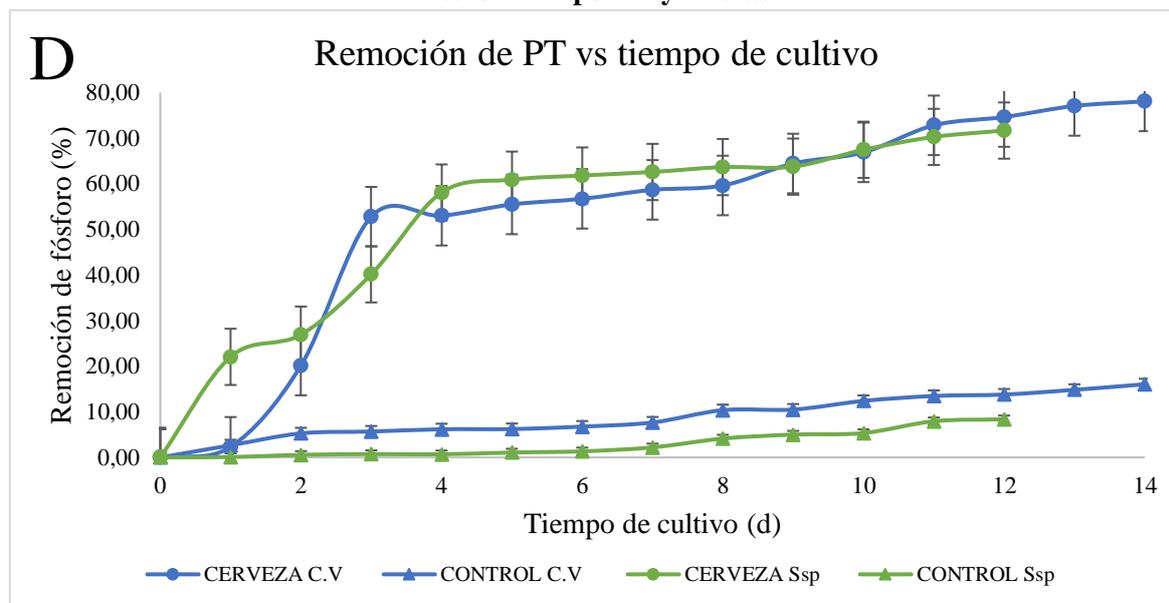
Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos (NT, PT y COT) (mg/l) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza previo a la inoculación y después de su inoculación por 14 y 12 días.

Parámetros fisicoquímicos	<i>Scenedesmus sp</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Agua residual S/N inocular	Agua residual inoculada	Remoción final (%)	Agua residual S/N inocular	Agua residual inoculada	Remoción final (%)
Nitrógeno total (mg/l N)	31	45,5	75,82	120	131	60,31
Fósforo total (mg/l PO₄³⁻)	136,7	154,2	71,66	492,5	511,4	78,06
Carbono total (mg/l C)	859,5	864,5	78,08	856,4	868	52,77

En la figura D se observa el porcentaje de remoción de fósforo total de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual de cerveza durante 14 y 12 días, respectivamente, junto a sus controles en medio BBM. En *Chlorella vulgaris* se ve un valor inicial de fósforo (tabla 2) de 511.4 ± 11.1723 mg/l PO₄³⁻ y un valor final de 112.2 ± 6.2225 mg/l PO₄³⁻ en el día 14 con un porcentaje de remoción del 78.06 %, mientras que su control contiene las siguientes concentraciones de fósforo 111 ± 21.7789 mg/l PO₄³⁻ inicial y 93.2 ± 1.5556 mg/l PO₄³⁻ final y un porcentaje de remoción del 16.04 %. Para la siguiente especie se tienen los siguientes valores de concentración de fósforo (tabla 2) al inicio 154.2 ± 4.1012 mg/l PO₄³⁻ y al final 43.7 ± 0.7071 mg/l PO₄³⁻ con una remoción del 71.66 % mientras que su control en medio BBM tienen valores de 116.05 ± 2.8991 mg/l PO₄³⁻ y 106.35 ± 0.6364 mg/l PO₄³⁻ con una remoción del 8.36 %.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

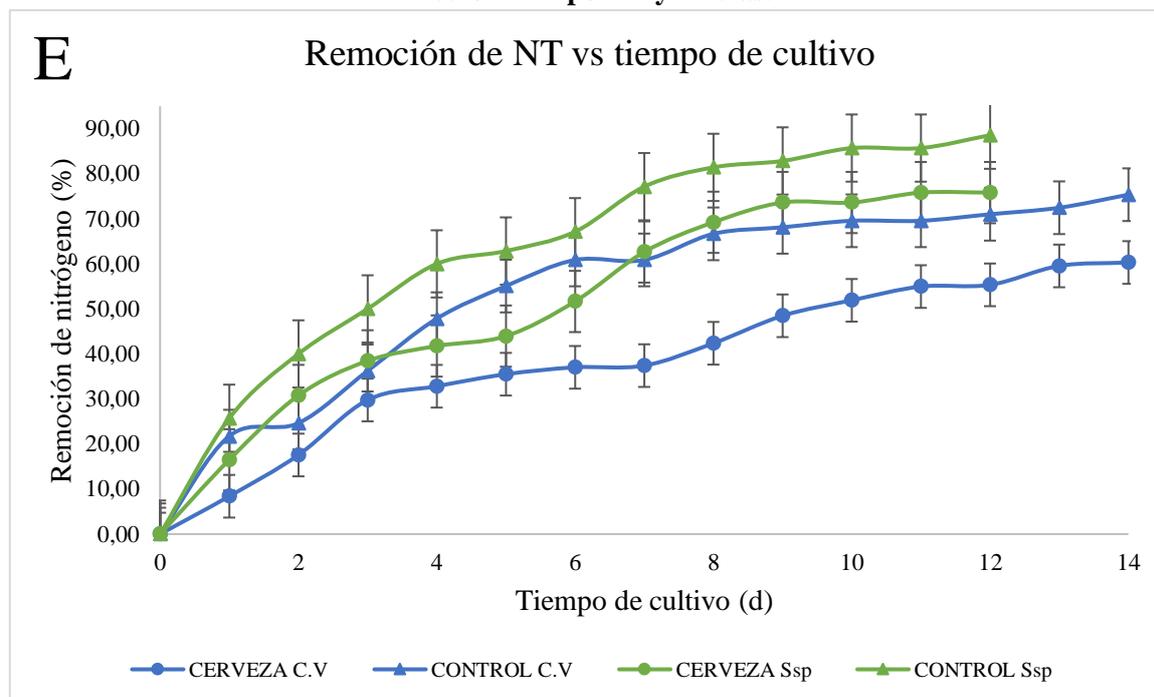
Figura D: Remoción de fósforo total (%) vs tiempo de cultivo (d) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.



En la figura E se encuentra graficado el porcentaje de remoción de nitrógeno total de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual de cerveza durante 14 y 12 días para cada especie con sus respectivos controles cultivados en medio BBM. Para la especie *Chlorella vulgaris* contiene un valor inicial de nitrógeno (tabla 2) de 131 ± 4.9497 mg/l N y un valor final de 52 ± 5.6569 mg/l N con un porcentaje de remoción del 60.31 % y para su control en BBM se obtuvo un valor inicial de 45.5 ± 2.1213 mg/l N y un valor final de 8.5 ± 0.7071 mg/l N, equivalente a una remoción del 75.36 %. En *Scenedesmus sp* el valor inicial en agua residual de cerveza fue (tabla 2) de 35 ± 1.4142 mg/l N y su valor final fue de 11 ± 0 mg/l N con un porcentaje de remoción del 75.82 %, mientras que con su control en medio BBM se obtuvieron valores de 34.5 ± 0.7071 mg/l N y 4 ± 1.4142 mg/l N con una remoción del 88.57 % al día 12.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

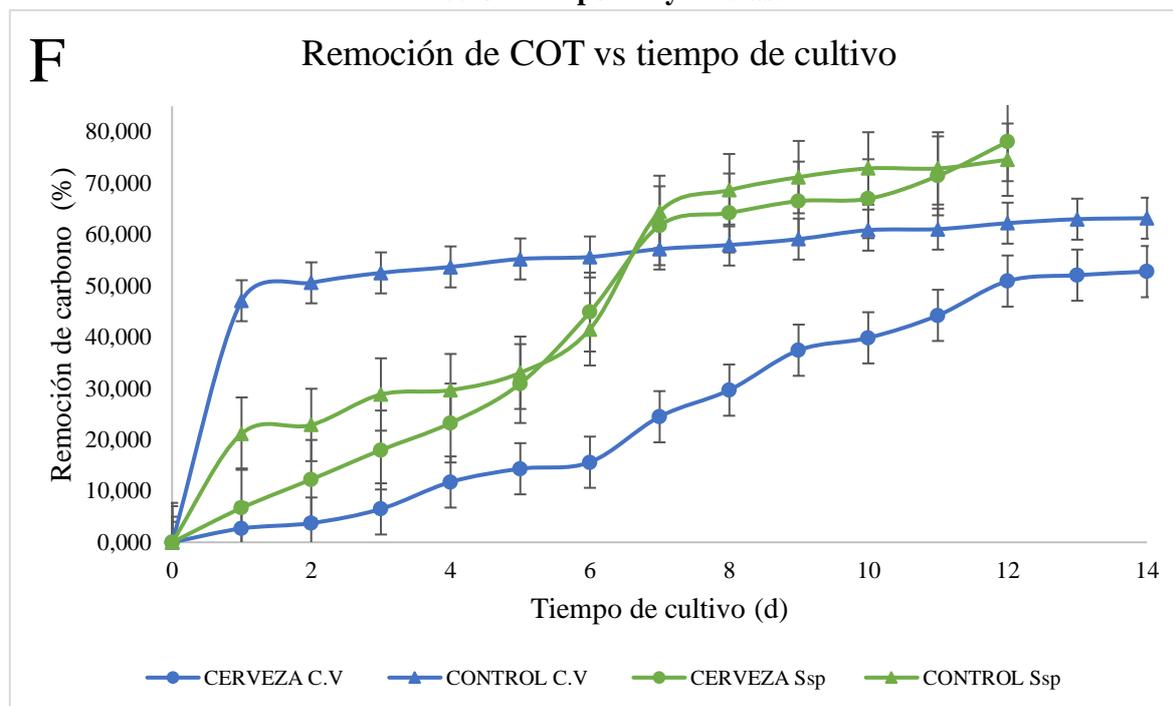
Figura E: Remoción de nitrógeno total (%) vs tiempo de cultivo (d) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.



En la figura F se ilustran los porcentajes de remoción de carbono total de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual de cerveza por un periodo de 14 y 12 días, respectivamente; incluyendo sus respectivos controles en medio BBM para cada especie. El valor inicial de carbono en *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de cerveza (tabla 2) fue de 868 ± 1.4142 mg/l C y el valor final fue de 410 ± 7.0711 mg/l C, teniendo un porcentaje de remoción fue de 52.77 %; en cambio su control en medio BBM tuvo un valor inicial de 258 ± 29.6985 mg/l C y su valor final fue de 95 ± 1.4142 mg/l C, con una remoción del 63.18 %. En *Scenedesmus sp* sus valores en agua residual de cerveza (tabla 2) fueron de 864.5 ± 0.7071 mg/l C inicialmente y 189.5 ± 2.1213 mg/l C finalizando al día 12 con una remoción del 78.08 %, los valores de su control en medio BBM fueron inicialmente de 59 ± 1.4142 mg/l C y finalmente al día 12 su valor fue de 15 ± 1.1442 mg/l C con una remoción del 74.58 %.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Figura F: Remoción de carbono total (%) vs tiempo de cultivo (d) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.



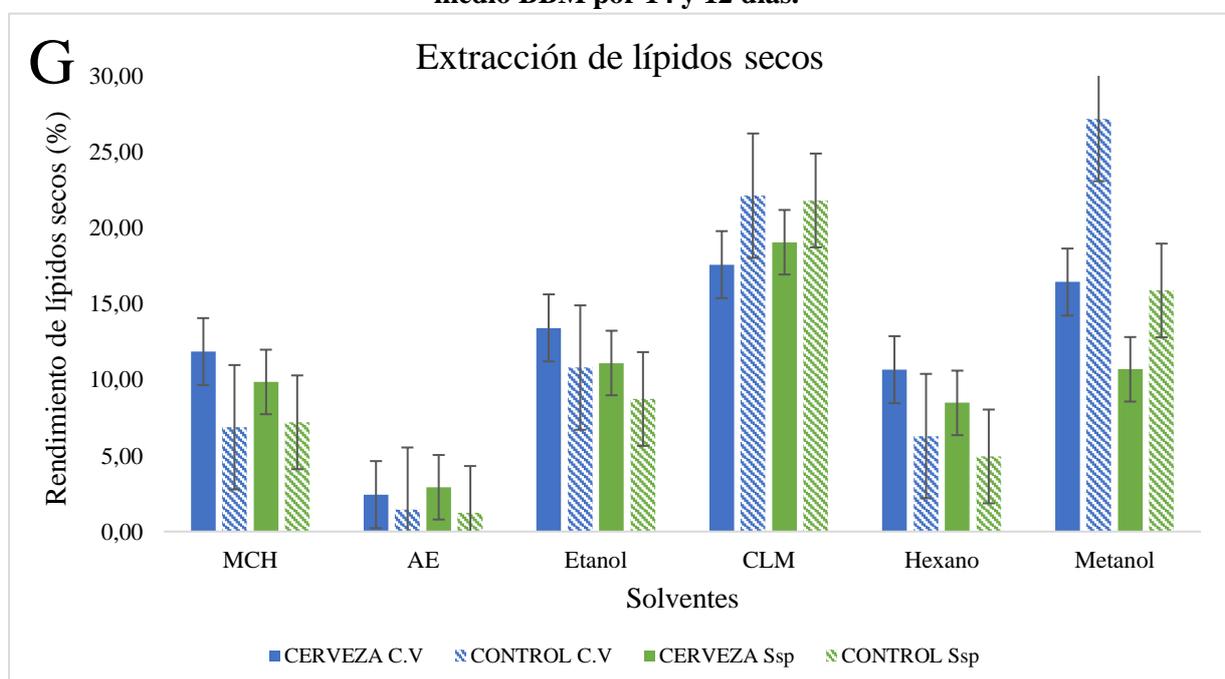
- **Extracción de lípidos.**

En la figura G se encuentran los porcentajes de extracción de lípidos obtenidos a partir de la biomasa seca expuestos a seis solventes orgánicos diferentes que fueron: metilciclohexano, acetato de etilo, etanol, cloroformo: metanol (1:2), hexano y metanol. El mejor solvente extractor para *Chlorella vulgaris* con biomasa seca cultivada en agua residual de cerveza fue el cloroformo: metanol (1:2) con un porcentaje de extracción del 17.59 % m/m y con una productividad de $1.58 \cdot 10^{-4}$ g/l*d, pero para su control el mejor solvente fue el metanol con un porcentaje del 27.19 % m/m y una productividad de $2.43 \cdot 10^{-4}$. Para *Scenedesmus sp* el mejor solvente al igual que *Chlorella vulgaris* fue el cloroformo: metanol (1:2) con un porcentaje del 19.07 % m/m y una productividad de $1.71 \cdot 10^{-4}$ g/l*d. Su control también tuvo el mismo solvente como mejor extractor de lípidos con un porcentaje del 21.82 % m/m y productividad de $1.97 \cdot 10^{-4}$ g/l*d.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

El segundo y tercer mejor solvente extractor en biomasa seca para *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de cerveza fueron el metanol y etanol, con un porcentaje de extracción de 16.44 % m/m y una productividad de $1.49 \cdot 10^{-4}$ g/l*d para metanol y 13.42% m/m con una productividad de $1.20 \cdot 10^{-4}$ g/l*d para etanol, respectivamente. Para su control en medio BBM el segundo y tercer mejor solvente fue el cloroformo: metanol (1:2) y etanol sus valores fueron del 22.13 % m/m y 10.81% m/m con productividades de $1.99 \cdot 10^{-4}$ g/l*d y $9.68 \cdot 10^{-5}$ g/l*d para cada solvente, respectivamente. En cambio para la especie *Scenedesmus sp* el segundo y tercer mejor solvente extractor de lípidos con biomasa seca cultivada en agua residual de cerveza fueron el etanol y el metanol, para el etanol su porcentaje de extracción fue del 11.11 % m/m y una productividad de $1.00 \cdot 10^{-4}$ g/l*d y para el metanol fue del 10.69 % m/m y una productividad de $9.75 \cdot 10^{-5}$ g/l*d, para su control al igual los siguientes mejores solventes extractores de lípidos fueron el metanol y etanol con los siguientes valores en metanol su porcentaje fue del 15.89 % m/m con productividad de $1.43 \cdot 10^{-4}$ g/l*d y para el etanol fue del 8.74 % m/m con productividad de $7.89 \cdot 10^{-5}$ g/l*d.

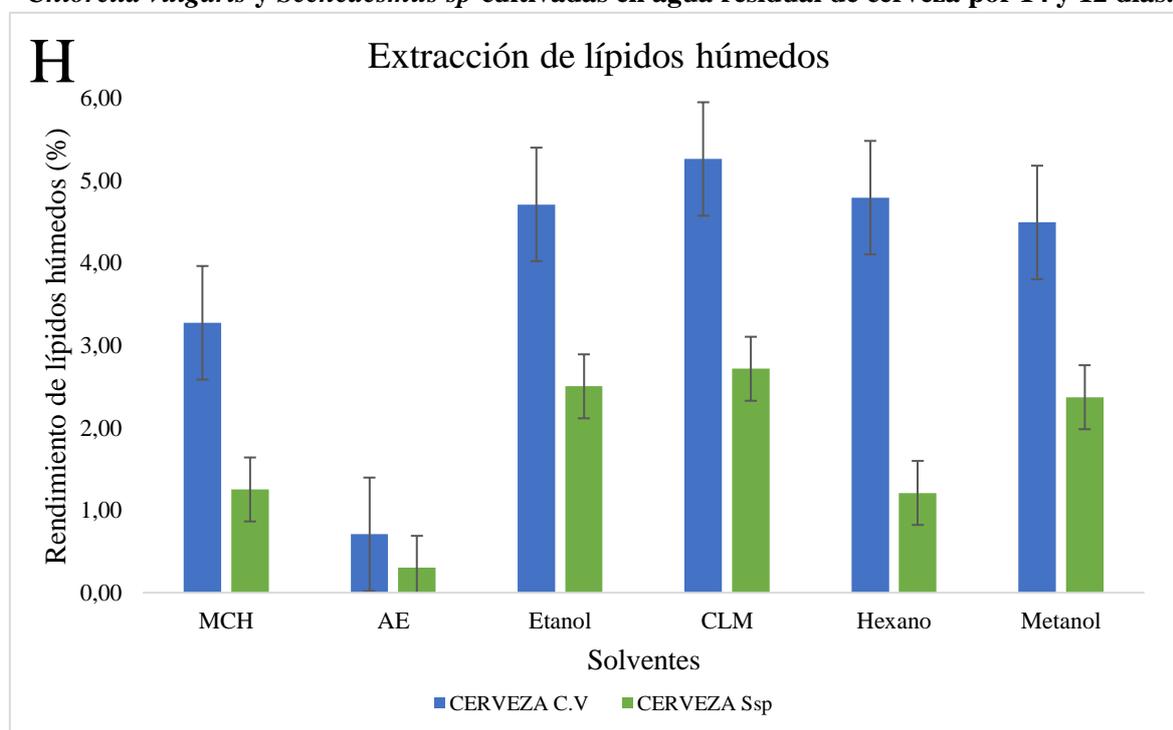
Figura G: Determinación de la extracción de lípidos con biomasa seca de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

En la figura H se presentan los porcentajes de extracción de lípidos de la biomasa húmeda con seis solventes orgánicos diferentes: metanol, etanol, cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo, hexano y metilciclohexano de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual de cerveza. Los tres mejores solventes extractores en términos de porcentajes en peso de lípidos y productividades *Chlorella vulgaris* fueron cloroformo: metanol (1:2) (5.26 % m/m con 0.0854 mg/l*d), etanol (4.71 % m/m con 0.2125 mg/l*d) y metanol (4.49 % m/m con 0.2121 mg/l*d) y para *Scenedesmus sp* fueron los tres mismos solventes con porcentajes de extracción y una productividad de 2.72 % m/m con 0.159 mg/l*d para cloroformo: metanol (1:2), 2.50 % m/m con 0.134 mg/l*d para etanol y 2.37 % m/m con 0.129 mg/l*d para metanol.

Figura H: Determinación de la extracción de lípidos con biomasa húmeda de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza por 14 y 12 días.



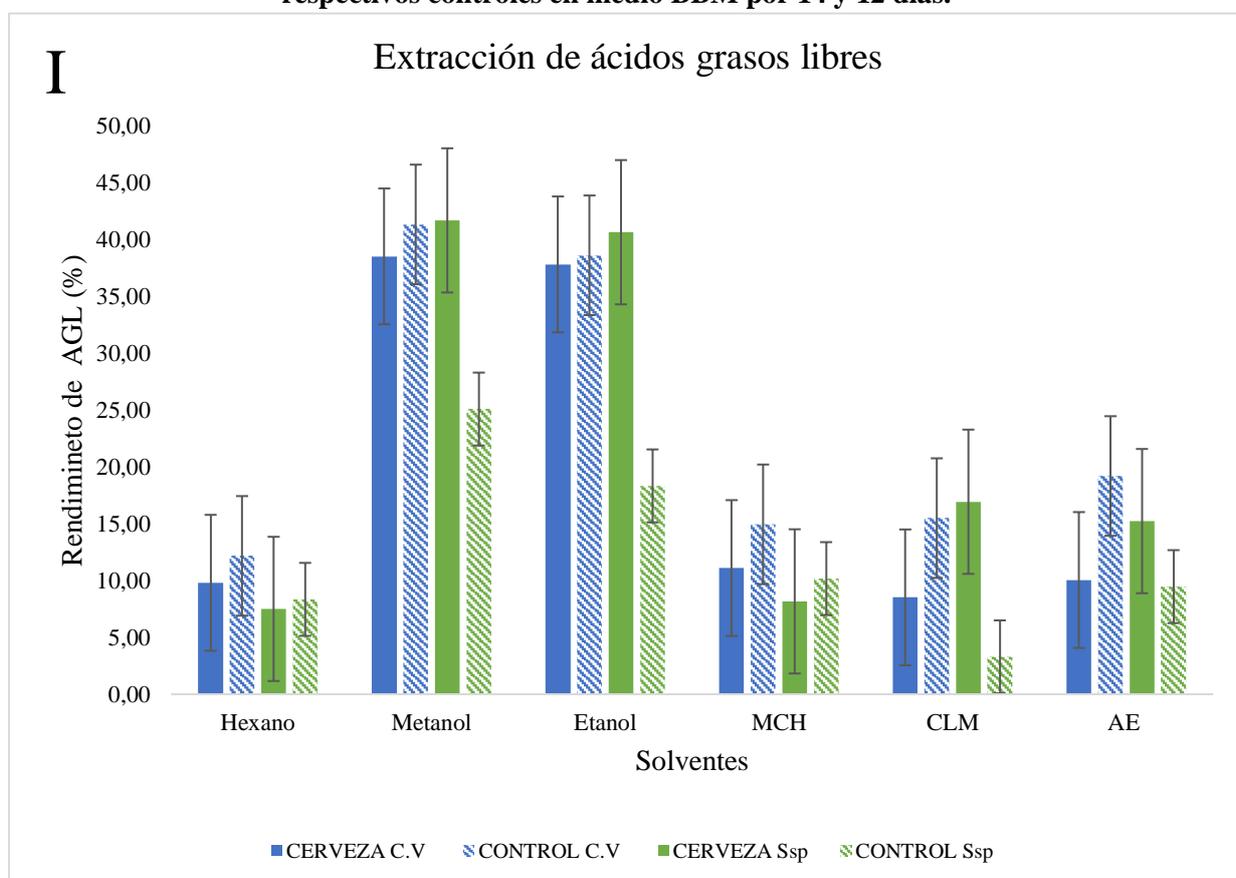
- **Extracción de AGL.**

En la figura I muestra los porcentajes de extracción de ácidos grasos libres (AGL) de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* con seis solventes orgánicos diferentes: hexano, metilciclohexano, metanol, etanol, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

cultivados en agua residual de cerveza y en medio BBM como control. Los tres mejores porcentajes de AGL para *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual fueron 38.52 % m/m con metanol, 37.81 % m/m con etanol y metilciclohexano con 11.10 % m/m, mientras que para su control fueron metanol, etanol y acetato de etilo con 41.33 %, 38.61 % y 19.20 % m/m, respectivamente. Para la siguiente especie cultivada en agua residual se encuentra que los mejores tres solventes extractores fueron el metanol, etanol y cloroformo: metanol (1:2) con un porcentaje de 41.68 %, 40.64 % y 16.93 % m/m, respectivamente y su control cultivado en medio BBM fueron el metanol, etanol y metilciclohexano con 25.09 %, 18.33 % y 10.17 % m/m para cada solvente.

Figura I: Determinación de la extracción de ácidos grasos libres (AGL) con biomasa seca de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza con sus respectivos controles en medio BBM por 14 y 12 días.



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

- **Extracción de FAMEs.**

En las figuras J, K, L y M muestra los porcentajes de extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) hechos con los extractos de lípidos de la biomasa seca y biomasa húmeda con los seis solventes orgánicos (hexano, metanol, etanol, metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo), adicionalmente las extracciones de FAMEs hecha con la biomasa directa y AGL extraídos con metanol.

Las figuras J y K muestra las extracciones de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* utilizando un catalizador heterogéneo (resina comercial CT-269), donde en la figura J se observan resultados de FAMEs a partir de los lípidos extraídos con biomasa húmeda de las dos especies aplicando el catalizador resina y se aprecia que las tres mejores extracciones de FAMEs para ambas especies se obtuvieron a partir de lípidos extraídos con los solventes metanol, etanol y cloroformo: metanol (1:2). Para *Scenedesmus sp* se obtuvieron valores del 35.5 %, 62.5 % y 67 % m/m, respectivamente; pero para la especie *Chlorella vulgaris* se presentaron valores del 32 %, 31 % y 23 % m/m de extracción. La figura K en cambio, presenta los valores de extracción de FAMEs de las dos especies a partir de lípidos extraídos con biomasa seca donde las tres mejores extracciones para *Chlorella vulgaris* se obtuvieron a partir de los solventes etanol, metilciclohexano y cloroformo: metanol (1:2) con porcentajes del 44 %, 46 % y 43 % m/m, respectivamente. Sus porcentajes para la extracción a partir de la biomasa seca directa y AGL fueron del 20.79 % y 21 % m/m; en cambio para *Scenedesmus sp* las tres mejores extracciones fueron hechos a partir de los solventes metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo con 76 %, 44.5% y 76 % m/m para la biomasa directa y AGL fueron del 14.62 % y 75 % m/m.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Figura J: Determinación de la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) con biomasa húmeda y resina de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza por 14 y 12 días.

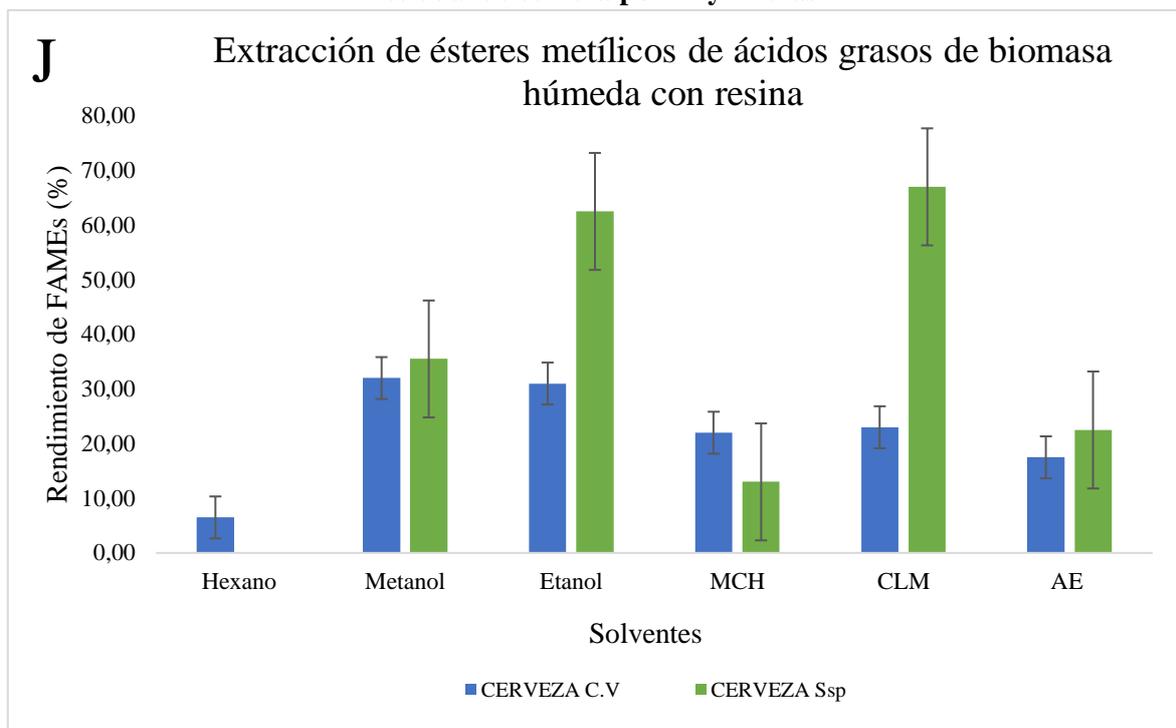
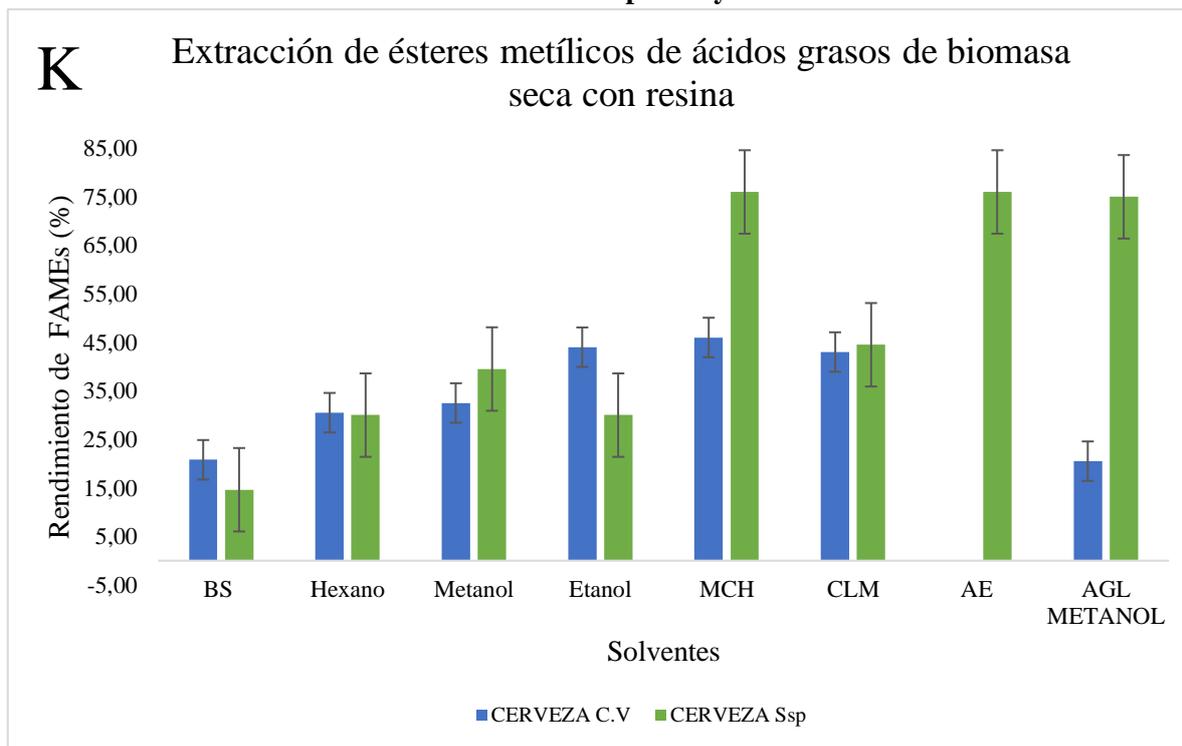


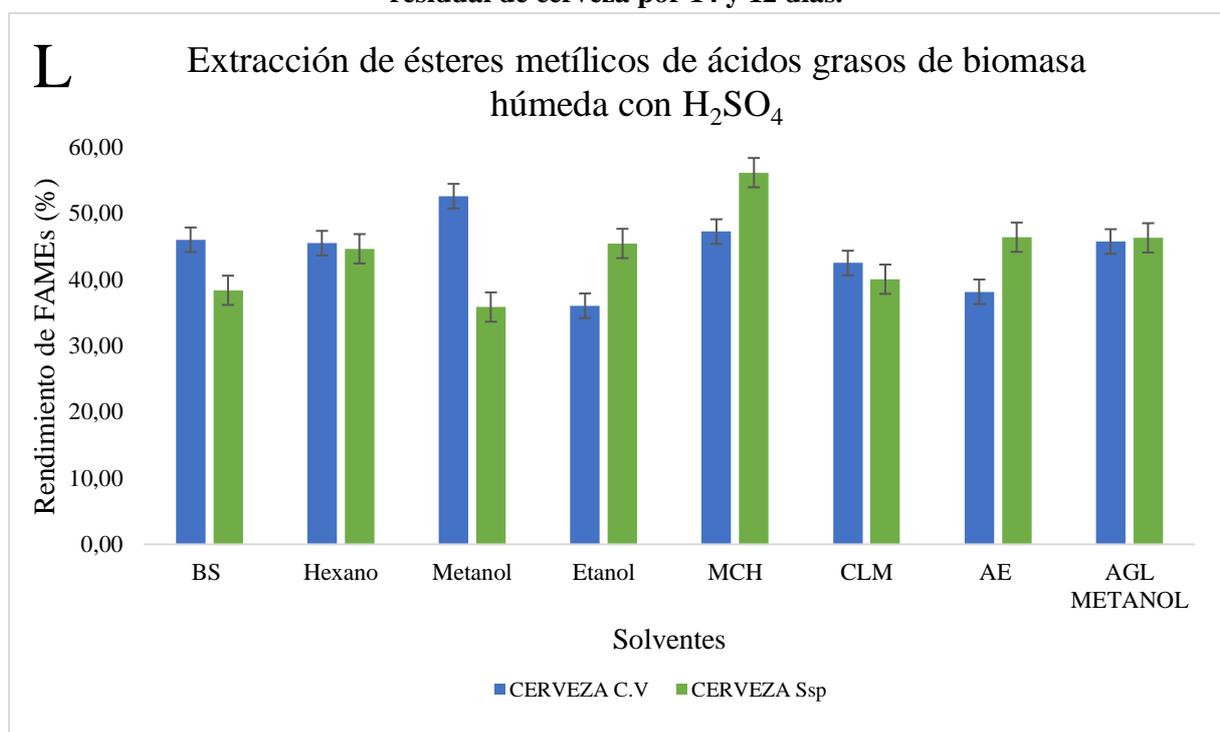
Figura K: Determinación de la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) con biomasa seca y resina de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza por 14 y 12 días.



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

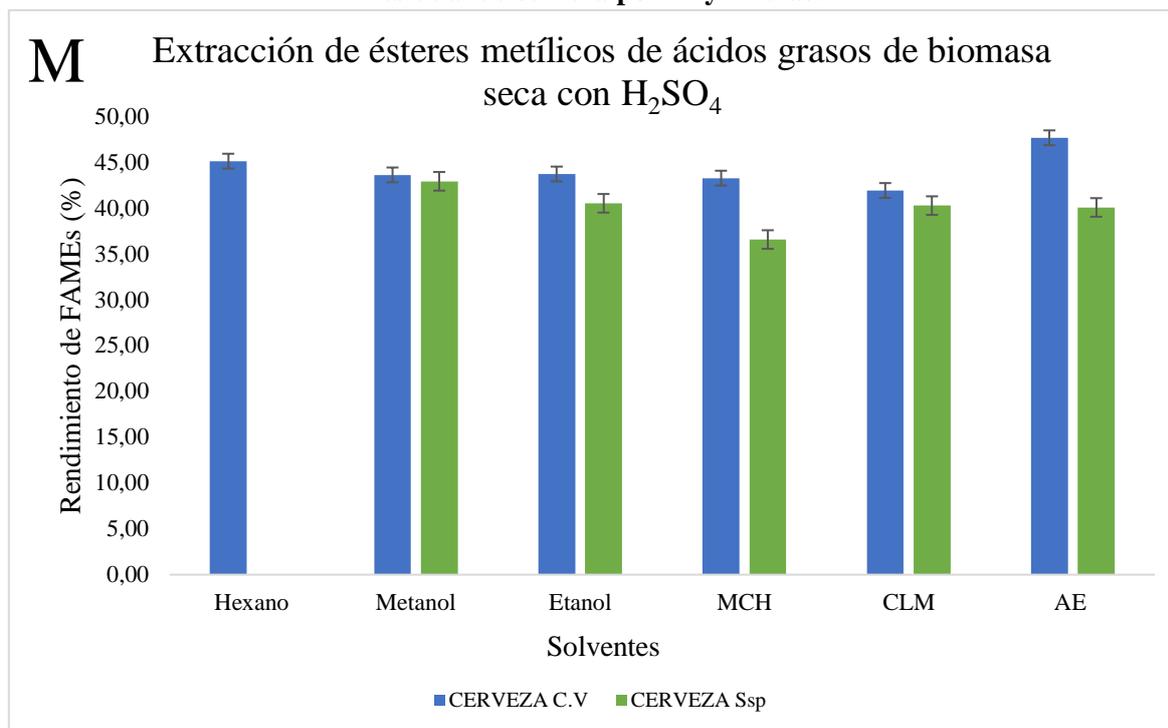
En la figura L y M se muestran las extracciones de FAMES de *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado como catalizador homogéneo. En la figura L se encuentran representados los porcentajes de extracción hechos a partir de lípidos extraídos con la biomasa húmeda en donde los tres mejores solventes para *Chlorella vulgaris* fueron hexano, etanol y acetato de etilo con el 45.1 %, 43.7 % y 47.65 % m/m, respectivamente. Para *Scenedesmus sp* fueron metanol, etanol y cloroformo: metanol (1:2) con 42.9 %, 40.5 % y 40.25 % m/m. En la figura M se presentan los valores de porcentaje de FAMES con los lípidos extraídos a partir de la biomasa seca donde la especie *Chlorella vulgaris* con los tres mejores solventes hexano, metanol y metilciclohexano obtuvo valores de 45.5 %, 52.6 % y 47.25 % m/m y para la extracción con la biomasa directa y el AGL en metanol tienen valores de 46.01 % y 45.75 % m/m. Para *Scenedesmus sp* los tres solventes fueron etanol, metilciclohexano y acetato de etilo con el 45.45 %, 56.15 % y 46.4 % m/m, los valores para la biomasa seca directa y AGL en metanol son el 38.38 % y 46.3 % m/m.

Figura L: Determinación de la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) con biomasa húmeda y H_2SO_4 de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza por 14 y 12 días.



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Figura M: Determinación de la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) con biomasa seca y H_2SO_4 de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en agua residual de cerveza por 14 y 12 días.



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- **Crecimiento celular.**

En la figura A se observan valores obtenidos de crecimiento celular de la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de cerveza donde se ve un periodo llamado fase de retraso o adaptación al medio hasta el día 4 como lo menciona Chinnasamy et al., (2010), un periodo rápido a diferencia del estudio de Subramaniyam et al., (2016) debido que la turbidez del medio es muy alta evitando la penetración de la luz y afectando de esta manera el proceso de fotosíntesis y por ende su crecimiento (Larsdotter, 2006); transcurrido estos días hay un periodo de crecimiento en fase exponencial hasta el día 14, a diferencia de su control cultivada en medio BBM, que alcanzó su mayor crecimiento en el día 4 sin tener periodo de adaptación; su fase estacionaria estuvo entre el día 4 y 10 y a partir del día 10 se observa la fase de muerte celular; cabe recalcar que la dilución del agua residual de cerveza para esta especie fue 1:10 y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

la dilución medio de cultivo microalgas fue también 1:10. En comparación con el estudio realizado por Farooq et al., (2013) donde se realiza el tratamiento del agua residual de cerveza el cual obtuvo casi 10 veces más el crecimiento de células; esto pudo deberse a que la relación cerveza microalga fue de 1:2 y su turbidez fue menor en comparación con este estudio. El aumento en la concentración de células guarda relación con la disminución de nutrientes lo que quiere decir que las microalgas utilizan los nutrientes para su desarrollo y crecimiento.

Para *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual de cerveza se aprecia un comportamiento normal sin tener periodo de adaptación debido a que el agua residual tenía una dilución 1:20 este factor de dilución se la realizó para reducir la turbidez, los nutrientes y el color mejorando la captación de luz para el mecanismo de fotosíntesis por parte de las microalgas y por ende su crecimiento celular a diferencia de la utilizada en la anterior especie. Se ve la fase exponencial hasta el día 7 con un valor de $7.5 \cdot 10^6$ cel/ml y su fase estacionaria hasta el día 9; a partir de este día se ve muerte celular coincidiendo con el estudio de Yirgu et al., (2020), resultados similares se obtuvieron en el estudio de Nagi et al., (2020) donde utilizaron *Scenedesmus sp* para producción de biocombustible a partir de agua residual de curtiduría donde se obtuvo un valor máximo de crecimiento de $7 \cdot 10^6$ cel/ml, al igual que el de este estudio, y a diferencia de otro estudio donde se analizó el efecto del agua residual de almazara en *Scenedesmus sp* (Dahmen-Ben Moussa et al., 2021) donde se obtuvo un valor máximo de $4 \cdot 10^6$ cel/ml, un valor menor en comparación con los estudios anteriores. El control en este estudio alcanzó su fase exponencial hasta el día 6, luego la fase estacionaria hasta el 11 y después su muerte celular.

Para las dos especies se percibe que sus controles cultivados en BBM obtuvieron un mayor crecimiento que en el agua residual, además de la influencia de la turbidez también pudo deberse al pH, ya que este influye en la solubilidad de los nutrientes y el dióxido de carbono. En condiciones desfavorables de pH se reduce la absorción de nutrientes por parte de las

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

microalgas y su producción de metabolitos y por ende afecta el crecimiento celular (Gómez-luna, 2021). En el agua residual de cerveza su pH estuvo entre 4-6 pero para los controles el pH se mantuvo entre 7-10.

En la figura B se ve un aumento de la absorbancia desde el día 0 hasta el día 14 para las dos especies; el control cultivado en BBM tuvo valores más altos en comparación a los cultivados en el agua residual de cerveza; en este medio para la especie *Scenedesmus sp* su valor más alto de densidad fue en el día 11 con 1.246; un valor mucho mayor que *Chlorella vulgaris* donde su valor más alto de absorbancia fue en el día 7 con 1.101. Esto pudo deberse a que la turbidez del medio era más alta en *Chlorella vulgaris* a comparación con la otra especie debido a la dilución realizada al medio. En el estudio realizado por Farooq et al., (2013) con *Chlorella vulgaris* obtuvo una mayor densidad óptica, esto pudo deberse a que el cultivo solo era de 500 ml, su pH se mantuvo entre 7-9 y la turbidez del medio fue menor en comparación a los 40 l realizados en el presente estudio; además de que los parámetros antes mencionados fueron menores. Comparando el estudio de Ferreira et al., (2017) donde se utilizó *Scenedesmus obliquus* el valor más alto de densidad óptica fue 0.2, un valor menor en comparación a este estudio. Esto pude estar relacionado a la dilución del medio de cultivo estudiado por Ferreira et al., (2017) que fue de 1:17; a diferencia de la dilución 1:10 realizada en este estudio; adicionalmente en el estudio anteriormente mencionado tiene valores de nutrientes bajos y se cultivaron 2 l en reactores por lotes primero para aclimatación y posteriormente se realizaron su cultivos pertinentes.

En la figura B se observan los valores de peso para las dos especies de peso seco teniendo aumento desde el día 0 hasta el 12 o 14. Sus respectivos controles en medio BBM tuvieron una mayor cantidad de peso seco que las cultivadas en el agua residual de cerveza y estos datos concuerdan con la biomasa total obtenida en la tabla 1. Para la especie *Scenedesmus sp* el valor más alto de peso seco fue de 0.007 g/l, en comparación con *Chlorella vulgaris* que

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

obtuvo un valor de 0.089 g/l; por ende, la producción de biomasa total fue mayor en esta última especie. Esto pudo deberse a que la especie *Scenedesmus sp* tuvo un tiempo de cultivo de 12 días, dos días menos comparado con la otra especie de microalga. En algunos estudios acerca de los parámetros de tratamiento de efluentes del agua residual de cerveza utilizando *Chlorella vulgaris* obtuvieron un peso seco mucho mayor al estudiado con 0.91 g/l esto pudo deberse a que el estudio se realizó sin luz por un tiempo de 16 días, a pH 7, con agitación constante y su turbidez era menor (H. J. Choi, 2016). Los estudios para *Scenedesmus sp* como el de Han et al., (2021) donde analiza la intensificación de la depuración del agua residual de cerveza mediante co-cultivos de microalgas, mostró al igual que el estudio anterior, valores superiores de peso seco en esta especie con 0.86 g/l, esto puede estar relacionado al tiempo de cultivo que fue de 10 días de cultivo, los nutrientes fueron controlados para aumentar la productividad de biomasa, la turbidez fue menor, su pH estaba entre 6.8-7.1 y el volumen de cultivo fue de 250 ml, favoreciendo el crecimiento y aumento de biomasa para las microalgas. Normalmente, los cultivos en menor escala presentan mejores resultados que los cultivos a mayor escala.

La productividad total mostrada en la tabla 1 fue mayor en los controles de las microalgas cultivadas en medio BBM, a diferencia de las especies de microalgas cultivadas en el agua residual de cerveza. Aunque la biomasa total de *Chlorella vulgaris* cultivada en el agua residual es superior a la biomasa de *Scenedesmus sp* con una diferencia de casi 2 gramos, su productividad es casi igual comparando con la otra especie los valores son: para *Chlorella vulgaris* 0.0273 g/l*d y para *Scenedesmus sp* 0.0279 g/l*d. Cabe destacar que las especies tuvieron diferentes días de cultivo (14 y 12 días, respectivamente). Aunque los controles revelan que la especie *Scenedesmus sp* tiene una mayor productividad que *Chlorella vulgaris*; en estudios hechos por Lois-Milevicich et al., (2020) donde analiza la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* usando agua residual de cerveza con diferentes sistemas obtuvo una mejor productividad de 0.47 g/l*d, a diferencia de 0.02 g/l*d, obtenido en el presente estudio. Esto

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

pudo deberse a los parámetros fueron diferentes ya que se controló el pH, el DQO con el medio de cultivo BG11 haciendo diluciones, hubo irradiación, agitación constante, el volumen fue de 30 ml y el periodo de incubación fue por 20 días (Lois-Milevicich et al., 2020). La especie *Scenedesmus sp* tuvo una productividad menor a los estudiados por Yirgu et al., (2021) donde se obtuvo un valor de productividad de 0.06433 g/l*d debido a que se controló el nivel de pH, los nutrientes, su turbidez, el volumen de cultivo fue de 2 l en una dilución medio de cultivo: microalga 1:5 y cultivada en un periodo de 18 días, lo que hace que su productividad aumente. No se encontraron valores significativos para crecimiento celular, absorbancia y peso seco ($p > 0.05$)

- **Remoción de nutrientes.**

En la figura D se ve los porcentajes de remoción de fósforo donde sus porcentajes fueron mayores en el agua residual de cerveza que los removidos en su control con el medio BBM; esto pudo deberse a que el fósforo se une fácilmente con algunos iones de CO_3^{2-} y Fe^{3-} resultando en su precipitación evitando la disponibilidad del nutriente para ser absorbido por las microalgas (Procházková et al., 2014), el pH ayuda a esta precipitación según W. Zhou et al., (2012). En *Chlorella vulgaris* su porcentaje de remoción fue mayor con un 78.06 % respecto de la remoción en *Scenedesmus sp* que tuvo 71.66 %; que puede deberse a los tiempos de cultivo, aunque si comparamos la remoción en el día 12 de *Chlorella vulgaris* aún sigue siendo mayor con 74.63 %. En estudios donde analizan los parámetros del agua residual de cerveza tratados con *Chlorella vulgaris* (H. J. Choi, 2016) donde su mayor remoción con luz constante y aireación fue de 66.18 % al décimo día, resultan muy similares al estudio presente ya que en el décimo día se obtuvo el 66.98 %, un valor doble al estudiado en tratamiento de efluentes primarios y secundarios (AlMomani & Örmeci, 2016). Esto pudo deberse a las diferentes concentraciones de fósforo que tienen las aguas residuales al ser tratadas. EL valor de *Scenedesmus sp* en el estudio fue menor al analizado por Yirgu et al., (2020) donde identifica

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

la remoción de nutrientes de *Scenedesmus sp* en agua residual de cerveza el valor obtenido fue 72.81 % debido a que el cultivo se realizó por 18 días con entrada de CO₂ que según estudios, aumenta la remoción de nutrientes al inyectar concentraciones del 1-5 % de CO₂ (W. Zhou et al., 2012), aunque comparando en el día 12 tiene valores entre 40-60 %, menores al del estudio de Ye et al., (2020) donde utiliza *Scenedesmus sp* para tratamiento de diferentes aguas residuales alcanzado valores del 80-90 % de remoción a los 12 días.

La figura de E muestra los resultados de remoción de nitrógeno teniendo como resultado que los controles de las especies de microalgas cultivadas en BBM fueron más altos que los cultivados en agua residual de cerveza; esto se debe a que el pH en este medio ayudó a su absorción. La especie *Scenedesmus sp* en agua residual tuvo en valor más alto de remoción de nitrógeno con 75.82 %, a diferencia del 60.31 % que removi6 *Chlorella vulgaris*. En estudios realizados con la misma especie se presenta una remoción del 90.11 % en agua residual de cerveza (H. J. Choi, 2016) se ve que el valor de remoción es más alto que el analizado y se debe a que el tiempo de cultivo fue de 16 días y el pH estaba controlado en 7.3. La remoción de nitr6geno para *Scenedesmus sp* en estudios hechos por Yirgu et al., (2020) donde estudia la remoción de nutrientes de esta especie en la misma agua residual y Ye et al., (2020) que estudi6 el tratamiento de aguas residuales con la misma especie fueron de 95.95 % y 87.6 %, respectivamente; valores mayores al presente estudio debido a su control de pH y sus diferentes días de cultivo.

En la figura F se muestra el porcentaje de remoción de carbono total y se ve que al igual que los anteriores nutrientes, los controles de las especies de microalgas tuvieron un mejor porcentaje de remoción que las cultivadas en el agua residual de cerveza. Para este nutriente, *Scenedesmus sp* cultivada en el agua residual tuvo un mejor porcentaje de remoción con 78.08 % mientras que *Chlorella vulgaris* que tuvo 52.78 %. Aunque este valor puede compararse con el estudio de Zheng et al., (2018) donde obtuvo una remoción del 32.5 % a los 8 días de cultivo

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

y en ese día en este estudio se obtuvo el 29.66 % de remoción. El estudio con *Scenedesmus sp* para la remoción de carbono total como el de Ye et al., (2020) muestra una remoción mayor al 90 % al día 12, un valor superior al presente estudio debido que la concentración de fósforo fue alta, no hubo control de pH y la turbidez era alta. Cabe recalcar que la absorción de carbono depende de la forma en que se encuentre disponible en el medio sea orgánico o inorgánico y la asimilación de las microalgas.

Por el momento, las concentraciones de COT, NT y PT están por encima del límite permitido en la normativa ambiental del Ecuador para descargas al sistema de alcantarillado (MAATE, 2011), pero se observa una clara tendencia a seguir disminuyendo las concentraciones si se alargan los días de cultivo; lo cual se puede estudiar para un futuro tratamiento del agua residual de la producción de cerveza.

Tabla 3: Límites máximos permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público por parte de la normativa de la calidad ambiental y de descarga de efluentes del Ecuador

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
*Carbono total	C	mg/l	No reporta
Cobre	Cu	mg/l	1
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	D.B.O ₅ .	mg/l	250
Demanda Química de Oxígeno	D.Q.O.	mg/l	500
*Fósforo Total	P	mg/l	15
Hierro total	Fe	mg/l	25
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	2
*Nitrógeno Total Kjeldahl	N	mg/l	40
Plomo	Pb	mg/l	0,5
Sulfatos	SO ₄ =	mg/l	400
Sulfuros	S	mg/l	1

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

- **Extracción de lípidos.**

En la figura G y H se muestran las extracciones de lípidos con biomasa seca y húmeda de *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* con seis solventes diferentes y sus respectivos controles en medio BBM solo para lípidos secos. Los lípidos húmedos para el control no están determinados en este estudio. El control tuvo mejores porcentajes de extracción que los cultivados en agua residual dando como mejor solvente extractor el cloroformo: metanol (1:2) para los dos medios de cultivo, las dos especies y en las dos biombras diferentes. La especie *Scenedesmus sp* con cloroformo: metanol (1:2) obtuvo un mayor porcentaje de extracción con 19.07 % m/m; a diferencia de la otra especie que obtuvo 17.59 % m/m, aunque en biomasa húmeda con el mismo solvente *Chlorella vulgaris* tuvo un mejor rendimiento de extracción con 5.26 % m/m de lípidos. En estudios realizados por Farooq et al., (2013) donde analiza la maximización de la productividad de lípidos con agua residual de cerveza tratada con *Chlorella vulgaris* mostró un porcentaje de extracción del 18.8 % m/m con el solvente cloroformo: metanol (2:1 v/v) porcentaje poco mayor que el mostrado en este estudio, aunque se ha podido tener un porcentaje mucho mayor que el presente utilizando otro tipo de agua residual como el analizado en Ebrahimian et al., (2014) el cual obtuvo un porcentaje de 25.92 % m/m con el mismo solvente y esto pudo deberse a que las concentraciones de fósforo y nitrógeno eran menores, lo que ayuda al aumento de la producción de lípidos, aunque disminuye la producción de biomasa según (Procházková et al., 2014). El estudio de Han et al., (2021) analiza la productividad de lípidos en *Scenedesmus sp* en agua residual de cerveza inyectando flujos de CO₂ y utilizando una mezcla cloroformo: metanol (2:1) v/v como solvente, encontrando un porcentaje del 20.60 % m/m de extracción, valor poco mayor al presente estudio que es 19.07 % m/m. Es importante mencionar que la diferencia mínima pudo deberse a que la concentración fósforo del anterior estudio fue de 7 mg/l en el agua residual, mientras que la de este estudio

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

fue de 154.2 mg/l. En otro estudio realizado por Ye et al., (2020) utilizando cloroformo: metanol (1:2) como solvente, el porcentaje de lípido extraído fue del 15.56 % m/l de la misma especie cultivada en una agua residual simulada; aquí la composición de nutrientes y minerales del medio tuvieron efecto en la productividad aunque Xin et al., (2010) muestra un porcentaje mayor a los analizados, entre 31-33 % m/m en efluentes secundarios.

El segundo mejor extractor de lípidos con biomasa saca fue el metanol para los dos tipos de especies en los dos medios de cultivo, debido a que el metanol tiene mayor polaridad que el etanol y tiene la facilidad de penetrar la pared celular de las microalgas hasta llegar al citoplasma para la extracción de lípidos (Yusoff et al., 2014) , aunque se obtuvo un mejor rendimiento de extracción con las microalgas cultivadas en BBM que es el control en comparación con las microalgas cultivadas en el agua residual de cerveza. La extracción en biomasa húmeda tuvo como segundo mejor solvente el etanol. El metanol tuvo mejor rendimiento de extracción de lípidos en agua residual con la especie *Chlorella vulgaris* con el 16.44 % m/m a partir de biomasa seca y un porcentaje de 4.49 % m/m a partir de biomasa húmeda, a diferencia de *Scenedesmus sp* que con el mismo solvente alcanzó valores de 16.44 y 2.37 % m/m, respectivamente. Comparando los resultados de *Chlorella vulgaris* con estudios realizados por Y. H. Yang et al., (2015) utilizando *Chlorella pyrenoidosa*, se observan resultados de extracción de lípidos con metanol del 31.9 % m/m, valor mucho mayor al obtenido en el presente estudio, pudiendo deberse a que el estudio utilizó un medio de cultivo específico para aumentar la extracción de lípidos, aunque el valor del resultado obtenido está más cercano al estudio de Qin et al., (2014) que utiliza metanol para obtener una extracción del 14.38 % m/m a partir de agua residual de lácteos. No se reportan estudios para la extracción de lípidos con metanol de *Scenedesmus sp* pero se ha obtenido en un estudio de Ido et al., (2018) con *Scenedesmus obliquus* un porcentaje de extracción del 25.31 % m/m con una mezcla de hexano: metanol. La presencia de alcohol en el medio de cultivo puede afectar la productividad de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

lípidos, así lo demuestra el estudio realizado por Yang et al., (2015) donde analiza la productividad de lípidos de microalgas cultivada en agua residual sin alcohol y otra adicionando alcohol, obteniendo una mejor extracción en la microalga cultivada en medio sin alcohol.

El tercer mejor solvente extractor de lípidos tanto en el control con medio BBM como en el agua residual fue el etanol en biomasa seca, pero en biomasa húmeda el tercero fue el metanol, el control tuvo un menor rendimiento de extracción en las dos especies que cultivadas en agua residual. *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de cerveza tiene una mejor extracción con este solvente con 13.42 % m/m, a diferencia de la otra especie que alcanzó un valor de 11.11 % m/m. El estudio de Dos Santos et al., (2015) analiza varios métodos de extracción de lípidos con *Chlorella vulgaris* demostrando que el porcentaje de extracción con etanol fue del 10 % m/m, porcentaje un poco menor al analizado en el presente estudio y esto pudo ser debido al medio de cultivo utilizado por los investigadores fue WC, que contenía pocas cantidades de carbono, nutriente esencial para el crecimiento y formación de lípidos. Otro estudio de Pérez et al., (2018), mostró un valor superior a los anteriores con 18 % m/m de extracción ya que se cultivó en un medio con abono y bicarbonato de sodio que facilitaron la producción de lípidos por parte de las microalgas. La extracción de lípidos con diferentes solventes de *Scenedesmus sp* fue analizado por Bermúdez-Sierra (2018) donde utiliza medio BG11y obteniendo valores de extracción con etanol del 10 % m/m, valor similar al obtenido por Cuello et al., (2017) con 10.9 % m/m, aunque Bermúdez-Sierra (2018) analiza la extracción adicionando HCl 3 mol/l al etanol y obtiene un valor extracción superior con más del 20 % m/m valor similar al obtenido por Pérez et al., (2018) que fue mayor al 17 % m/m.

La principal razón del por qué los solventes alcohólicos como metanol, etanol, y cloroformo-metanol tuvieron mejor resultado extracción en comparación con el acetato de etilo, el hexano y metilciclohexano es su polaridad, ya que la microalga al ser expuesta a un disolvente no polar como el hexano; interactúa con lípidos neutros (triglicéridos) en el

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

citoplasma, pero no pueden interactuar con lípidos neutros que se encuentran formando complejos con lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, carotenoides) ya que está unido por enlaces de hidrógeno a las proteínas de la membrana; esta interacción solo puede ser interrumpida por solventes polares como metanol (Dos Santos et al., 2015). La formación de los diferentes tipos de lípidos depende de la absorción de nutrientes del medio por parte de las microalgas.

- **Extracción de ácidos grasos libres.**

La figura I muestra la extracción de ácidos grasos libres (AGL) con seis solventes orgánicos diferentes de las dos especies de microalgas en dos diferentes medios de cultivo, en el que se observa que el control en medio BBM para la especie *Chlorella vulgaris* tuvo valores más altos de extracción que cultivada en agua residual de cerveza; esto se debe a las diferencias de concentraciones de nitrógeno y fósforo en los medios, ya que al tener una menor concentración de estos nutrientes aumenta la productividad de lípidos en las microalgas (Procházková et al., 2014), para los dos medios el solvente con mayor extracción fue el metanol, en cambio en *Scenedesmus sp* al ser cultivada en agua residual de cerveza tuvo un mejor porcentaje de extracción de ácidos grasos que su control en medio BBM. En los dos medios, el metanol fue el mejor solvente extractor al igual que en la anterior especie, aunque al comparar los resultados de las dos especies cultivadas en el agua residual se observa que *Scenedesmus sp* tiene mejores porcentajes de extracción que *Chlorella vulgaris* esto se debe a la diferencia de la dilución del medio; ya que al tener una mayor dilución se obtiene una reducción de nutrientes como en el caso de *Scenedesmus sp*.

Estudios hechos por Shen et al., (2015) donde analiza la biosíntesis de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* en condiciones de estrés en medio BG11 muestran un porcentaje de extracción de ácidos grasos del 30 % m/m en concentraciones normales del medio porcentaje

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

similar al obtenido con metanol y etanol en este estudio (38.52 % y 37.81 % m/m), pero al aumentar glucosa en el medio y limitar el nitrógeno y fósforo en el medio en el estudio de Shen et al., (2015) obtienen un 89.1 % m/m de extracción, lo que demuestra una clara dependencia de la microalga a la glucosa para ser transformado en ácidos grasos (Shen et al., 2015). Un valor similar presentó estos mismos autores sobre los efectos de surfactantes aniónicos en la extracción de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* donde obtuvo una extracción de 29.6 % m/m de AGL con el solvente hexano: metanol (7:3) y concentración de 1 % de H₂SO₄ como catalizador, pero al aumentar la concentración al 2 % obtuvo un valor del 84.4 % m/m, y sin H₂SO₄ obtuvo un valor del 17.4 % m/m. Hay estudios como el de Kialashaki et al., (2019) donde extrae AGL a partir de metanol e hidróxido de sodio como catalizador obteniendo un porcentaje del 2.85 % m/m, esto puede deberse a la diferencia de polaridades que afectan la capacidad de solubilidad de los compuestos como azúcares, grasas y pigmentos (Salazar Pérez, 2012), ya que compuestos no polares como algunos solventes ya mencionados pueden disolver compuestos no hidrosolubles como algunos ácidos grasos y lípidos, mientras que los solventes polares pueden disolver compuestos innecesarios para la producción de biocombustibles (Urribarrí et al., 2014).

El trabajo hecho por Chen et al., (2012) con *Scenedesmus sp* muestran resultados de extracción de AGL con cloroformo: metanol (1:2) del 70.3 % m/m, valor mucho mayor al obtenido en el presente estudio con el mismo solvente que fue del 16.93 % m/m; esto pudo deberse a que Chen utiliza medio BG11 controlando los nutrientes, inyecta dióxido de carbono al 1 %, utilizó biomasa previamente liofilizada y dos catalizadores en conjunto KOH y NaOH, aunque el valor obtenido en este estudio se aproxima más al de Vieira Viegas et al., (2020) donde caracteriza lípidos de *Scenedesmus sp* obteniendo un valor aproximado del 25 % m/m con el solvente cloroformo: metanol (2:1); esta diferencia poco mayor podría deberse a que al momento del secado de la biomasa la temperatura fue de 100 °C lo que facilitó la oxidación de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

lípidos y por ende el aumento de ácidos grasos. El análisis de Schroeder et al., (2015) aumenta ese valor cultivando microalgas en medio BG11 extrayendo los AGL con cloroformo: metanol (2:1), obteniendo el 65 % m/m, valor igual al estudiado por Chen et al., (2012).

- **Extracción de FAMEs.**

En las graficas J, K, L y M se muestran los porcentajes de extracción de FAMEs de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* con dos catalizadores diferentes: resina comercial CT-269 (heterogéneo) y ácido sulfúrico (homogéneo). Los FAMEs se extrajeron a partir de los lípidos extraídos de la biomasa seca y húmeda que se hicieron utilizando los seis solventes (metanol, etanol, hexano, metilciclohexano, acetato de etilo y cloroformo: metanol (1:2)), además se utilizó también la biomasa directa y el mejor AGL extraído que fue con metanol para analizar sus FAMEs.

Con la resina comercial para *Chlorella vulgaris* se conoció en este estudio que se obtuvo la mejor extracción de FAMEs con la utilización de los lípidos extraídos con biomasa húmeda y metanol con el 32 % m/m y utilizando los lípidos de la biomasa seca y etanol con el 44 % m/m. Para *Scenedesmus sp* se emplearon lípidos de la biomasa húmeda y cloroformo: metanol (1:2) obteniendo 67 % m/m de FAMEs y con los lípidos de la biomasa seca y metilciclohexano con se obtuvieron 76 % m/m en FAMEs. Para este catalizador, la especie *Scenedesmus sp* tiene mejores porcentajes de extracción a partir de los lípidos, además mejores extracciones de FAMEs con la biomasa directa y AGL extraído con metanol con el 14.62 % y 76 % m/m, respectivamente; a diferencia de *Chlorella vulgaris* con porcentajes del 20.79 % m/m en biomasa directa y 31.50 % m/m con AGL extraído con metanol.

Con el ácido sulfúrico para *Scenedesmus sp* se obtuvo el mejor porcentaje de extracción con el lípido extraído de la biomasa húmeda y solvente metanol con el 42.9 % m/m y los lípidos de la biomasa seca con metilciclohexano obteniendo valores del 56.15 % m/m, sus valores de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

extracción de FAMES utilizando la biomasa seca directa y con los AGL obtenidos del mejor solvente (metanol) fueron 38.38 % y 46.30 % m/m, respectivamente. Para la especie *Chlorella vulgaris* la mejor extracción se obtuvo a partir del lípido extraído con biomasa húmeda y acetato de etilo con un valor del 47.65 % m/m y utilizando lípidos a partir de la biomasa seca y metanol con el 52.60 % m/m. Los valores de FAMES con la biomasa seca directa y el mejor extracto de AGL fueron del 46.01 % y 45.75 % m/m, respectivamente. No se ven valores significativos para percibir en cual especie hay una mejor extracción de FAMES con ácido sulfúrico.

Se encontraron estudios de FAMES que hicieran con un método diferente al analizado en este estudio en las dos especies en estos estudios solo muestran análisis de FAMES por cromatografía de gases y muestran perfiles lipídicos y no resultados del rendimiento en peso de extracción de FAMES. A continuación, se muestra estudios de FAMES con las mismas especies de microalgas, pero con diferentes métodos de extracción en algunos de expresan sus resultados en (mg/g). Farooq et al., (2013) analizan el tratamiento de agua residual de cerveza usando *Chlorella vulgaris* y la extracción de FAMES a partir del lípido obtenido con cloroformo: metanol (2:1) mediante transesterificación con ácido sulfúrico como catalizador, encontrando por cromatografía de gases un resultado del 30 % en peso, al añadir glucosa en el medio los FAMES aumentan al 40 % m/m resultado similar al obtenido en este estudio con el mismo solvente (42.5 % m/m). La glucosa es una fuente de carbón que ayuda a la producción de FAMES (Perez-Garcia et al., 2011). Otro estudio muy similar fue realizado por Fazal et al., (2021) utiliza *Chlorella vulgaris* para biorremediación de agua residual textil donde extrae los lípidos con cloroformo: metanol (1:2) y luego utiliza el mismo método de extracción de FAMES del estudio anterior obteniendo un rendimiento del 9.12 % m/m, valor menor a los estudio anteriores debido a que los nutrientes en el agua residual textil eran escasos y el tinte del agua interfirió en el metabolismo celular de las microalgas.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Diversos estudios han mostrado que la temperatura y el catalizador usados al momento de la transesterificación influyen en el rendimiento de FAMEs tal como lo muestra Kialashaki et al., (2019) donde analiza las mejoras de condiciones de transesterificación a partir *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales municipales y utiliza los lípidos extraídos con cloroformo: metanol (4:5) y diferentes catalizadores (H_2SO_4 , H_3PO_4 y HCl) obteniendo el mejor resultado con H_2SO_4 con el 30 % m/m en FAMEs y al analizar en diferentes condiciones de temperatura 50, 60 y 70 °C obtiene un mejor resultado en 70 °C con el 50 % m/m de FAMEs. El estudio de Farzandi et al., (2020) muestra las condiciones óptimas para la producción de biodiesel con la misma especie donde analiza la extracción de lípidos con diferentes concentraciones de catalizador, utilizando agua residual de una planta de tratamiento de aguas como medio de cultivo; para la extracción de FAMEs utiliza biomasa directa, NaOH como catalizador y metanol. El estudio muestra un rendimiento más alto 75.5 % m/m con concentraciones bajas de catalizador 1 % m/m a diferencia del 3 % m/m; obteniendo 55.5 % m/m de FAMEs, un valor superior al obtenido en este estudio (46.01 % m/m); pudiendo estar relacionado a la alta concentración del catalizador, ya que aumenta la velocidad de saponificación e impide la conversión de AGL y triglicéridos en biocombustibles (Jordanov et al., 2007).

Cho et al., (2013) describe en *Chlorella vulgaris* el efecto de la hidrólisis enzimática en la extracción de FAMEs a partir de lípidos extraídos con hexano y cloroformo metanol (2:1) usando H_2SO_4 obteniendo valores de casi el 86.4 % y 62.6 % m/m sin hidrólisis, respectivamente; pero estos valores disminuyen al momento de tener hidrólisis al 72 % y 60 % m/m valores superiores al obtenido en este estudio 45.5 % y 42.5 % m/m respectivamente. (Shen et al., 2015) muestra en su estudio el efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo para el rendimiento de FAMEs obteniendo el 80 % de la biomasa directa al limitar estos compuestos.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

El análisis con *Chlorella vulgaris* de S. Wu et al., (2017) utiliza resina acrílica lipasa de *Candida antarctica* para la extracción a partir de lípidos extraídos con hexano obteniendo el 51.81 % m/m valor superior al obtenido en el estudio con resina que fue del 30.5 %, m/m esto se debe al diferente catalizador usado. (Herrera, 2021) usa la misma resina comercial con *Chlorella vulgaris* cultivada en agua de faenamiento porcino y obtiene resultados en FAMES a partir de lípidos extraídos con cloroformo: metanol (1:2) y metilciclohexano del 73 % y 57.5 % m/m, en este estudio se presentan valores menores con el 43 % y 46 % m/m, esto pudo deberse a los diferentes medios de cultivos utilizados.

Schroeder et al., (2015) analiza la extracción de FAMES con *Scenedesmus sp* a escala piloto en su método utiliza los lípidos extraídos con cloroformo metanol (2:1) y extrae sus FAMES con metóxido de sodio, ácido sulfúrico y metanol obteniendo una valore de extracción de 9.2 % m/m, valor mucho menor al obtenido en este estudio el cual fue de 40.5 % m/m; esto puede deberse al contenido de glucosa que se encuentran en los diferentes medios de cultivo, valores similares se encuentran en el estudio de Kim et al., (2015) donde usa el mismo método y utiliza un efluente de agua residual y obtiene 8.74 % m/m de FAMES, aunque se obtienen valores más altos en el estudio de Shin et al., (2014) donde se utiliza la misma especie y el mismo método y obtiene un contenido de FAMES partir de lípidos extraídos con cloroformo: metanol (2:1) del 65.08 % m/m y de hexano del 68.57 % m/m, valores superiores al presente estudio (40.05 y 44.65 % m/m). Shin et al., (2014) utiliza un medio basado en urea lo cual ayuda a la producción de lípidos.

El estudio hecho por Arora et al., (2019) utiliza *Scenedesmus sp* en diferentes concentraciones de agua de mar para analizar sus FAMES con ácido sulfúrico a partir de biomasa directa y obtiene el valor más alto del 34.38 % m/m en una concentración de 17.5 g/l de agua de mar; este valor se obtiene debido a que la salinidad provoca en la microalgas estrés, acumulando carbohidratos que se convertirán en FAMES y aumentando lípidos neutros. El valor

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

es similar al obtenido en el presente estudio con biomasa seca 38.38 % m/m. La concentración de catalizador en el momento de la extracción también puede influir como lo muestran los análisis hechos por W. Y. Choi et al., (2014) donde obtiene el 69.36 % m/m a 70 °C y una concentración del 5 % de catalizador. Chen et al., (2012) muestra extracciones con los mismos métodos anteriores del 78.3 % m/m y 56.2 % m/m en los días de cultivo 14 y 7, respectivamente.

Lai et al., (2016) usaron una resina epoxi de Spurr polimerizada con la ayuda de surfactantes, isopropanol y cloroformo: metanol (1:1) para extracción de FAMES de la biomasa directa de *Scenedesmus sp* obteniendo valores cercanos al 100 % m/m con cloroformo: metanol (1:1) y del 74 % m/m con isopropanol; estos porcentajes se obtienen gracias a la ayuda de los surfactantes utilizados en el estudio, a diferencia del presente que alcanzó un valor de 14.6 % m/m con biomasa directa.

(J. Y. Wu et al., 2017) demostró que la concentración de K_2HPO_4 , las diferentes fuentes de nitrógeno, el pH, la aireación y la dilución del agua residual afectan la productividad de FAMES por parte de las microalgas, el estudio muestra mejores resultados en todos los experimentos con aireación, cuando tiene un pH 10, cuando el agua no está en dilución, la concentración de K_2HPO_4 es de 8 mg/l y la fuente de nitrógeno es la urea en concentración de 1 g/l. Esto corrobora el estudio hecho por Arora et al., (2020) que demuestra que la baja concentración de nitrógeno y las diferentes fuentes de carbono aumentan el rendimiento de lípidos. Adicionalmente, muestra que los días de cultivo influyen en el rendimiento, tal como lo indica Chen et al., (2012); y el tipo de catalizador utilizado influye en la extracción. X. Zhou et al., (2019) muestra que la temperatura al momento de la transesterificación influye en los FAMES obtenidos de *Scenedesmus obliquus* con una mejor temperatura de 120 °C.

Los estudios de Herrera, (2021) donde cultiva *Scenedesmus sp* en agua residual porcina muestran resultados de FAMES en biomasa seca con la misma resina comercial del 61 % m/m

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

a partir de lípidos extraídos con cloroformo: metanol (1:2) y 69 % m/m a partir del acetato de etilo, el valor con cloroformo: metanol (1:2) es mayor en comparación con el presente estudio que se obtuvo el 44.5 % m/m; pero en el acetato de etilo es menor ya que se obtuvo el 76 % m/m, esto se debe a la diferencia de medios de cultivo y su concentración de nutrientes del medio que se utilizaron en los dos estudios.

Los resultados revelan que las condiciones de cultivo no son las adecuadas para la extracción de grasas debido a su bajo porcentaje de obtención y por lo tanto no tiene potencial para obtención de biocombustibles, aunque sería recomendable el análisis del perfil lipídico de las extracciones para conocer qué tipo de lípidos tuvo la mayor extracción y descartar la posibilidad de utilización del agua residual de cerveza como medio para producción de biocombustible. Los resultados podrían mejorarse con un control adecuado de pH, turbidez, reduciendo de la concentración de los nutrientes como el nitrógeno y fósforo, con el suministro de CO₂, el aumento de la dilución del medio y finalmente hacer el cultivo en dos etapas, antes de escalar al fotobiorreactor de 40 l se debe primero aclimatar a las microalgas haciéndolas crecer en botellas de 1 l con el agua residual por 14 días y a continuación cultivarlas en el fotobiorreactor, evitando así la fase de retraso.

7. CONCLUSIONES

Se demostró que las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* pueden crecer en agua residual de cerveza para la obtención de biomasa; con productividad total comparable con especies de microalgas que han demostrado un alto rendimiento de extracción de sus lípidos con el fin de obtener biocombustible.

En la obtención de su biomasa se demostró que las especies *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* tienen similares producciones de biomasa por ende mucha similitud en los valores de crecimiento celular.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Las microalgas de ambas especies generaron una remoción de nutrientes alta y cercana a los estudios de diferentes autores, demostrando de esta manera su potencial para biorremediación de aguas residuales. Las concentraciones de COT, NT y PT luego de los cultivos son altas y superan el límite permitido en la normativa ambiental del Ecuador para ser descargados al sistema de alcantarillas; sin embargo, no se descarta la posibilidad de utilizar las microalgas para este fin con alargamiento del tiempo de cultivo.

En la extracción de lípidos con biomasa seca y húmeda y la extracción de AGL se identificó que los tres mejores solventes extractores fueron etanol, metanol y cloroformo metanol (1:2). Para *Chlorella vulgaris* se obtuvieron mejores porcentajes de extracción en FAMEs usando H₂SO₄, en cambio para *Scenedesmus sp* fue usando resina comercial CT-269.

Aunque los valores en el rendimiento de lípidos, AGL y FAMEs son bajos comparado con estudios de otros autores, no se descarta el posible uso del cultivo de estas dos especies en agua residual de cerveza con algunas modificaciones en este medio para la obtención de una mayor cantidad de grasas con un alto rendimiento en sus lípidos y posteriormente la producción de biocombustibles.

8. RECONOCIMIENTO

Los reactivos y materiales de este trabajo fueron financiados por la DII proyecto P101617_2.2 de la Universidad Internacional SEK, Ecuador; otros materiales y equipos fueron donados por la Corporación para la Investigación Energética del Ecuador.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>
- AlMomani, F. A., & Örmeci, B. (2016). Performance Of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris Oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecological Engineering*, 95, 280–289.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.038>
- Amenorfenyo, D. K., Huang, X., Zhang, Y., Zeng, Q., Zhang, N., Ren, J., & Huang, Q. (2019). Microalgae brewery wastewater treatment: Potentials, benefits and the challenges. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11).
<https://doi.org/10.3390/ijerph16111910>
- Arora, N., Laurens, L. M. L., Sweeney, N., Pruthi, V., Poluri, K. M., & Pienkos, P. T. (2019). Elucidating the unique physiological responses of halotolerant *Scenedesmus* sp. cultivated in sea water for biofuel production. *Algal Research*, 37(May 2018), 260–268.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.003>
- Arora, N., Tripathi, S., Pruthi, P. A., Poluri, K. M., & Pruthi, V. (2020). Assessing the robust growth and lipid-accumulating characteristics of *Scenedesmus* sp. for biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27449–27456.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-07023-8>
- Bastidas, O. (n.d.). *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*. Retrieved October 1, 2021, from www.celeromics.com

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

BERMUDEZ-SIERRA, J. J. (2018). EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA

Scenedesmus sp. COM DIFERENTES MISTURA DE SOLVENTES ORGÂNICOS.

Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial, 16(2), 88–98.

<https://doi.org/10.18684/bsaa.16n2.1169>

Carlos Fernández-Linares, L., Montiel-Montoya, J., Aarón Millán-Oropeza, ;, Jesús, Y., &

Badillo-Corona, A. (n.d.). *PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE*

MICROALGAS PRODUCTION OF BIOFUELS OBTAINED FROM MICROALGAE

(Vol. 8).

César Narváez Rincón, P., José Sánchez, F., Alfonso Torres, J., Fernanda Ponce de León, L.,

José Sánchez Castellanos, F., químico Sc, ingeniero M., & asociado, profesor. (2004).

Fatty acid methyl esters production: Fatty acid methyl esters production: Fatty acid

methyl esters production: Fatty acid methyl esters production: Fatty acid methyl esters

production: chemical process variables chemical process variables chemical process

variables chemical process variables chemical process variables. 55, 41–50.

Chang, R., & Murillo, L. (2017). Determinación espectrofotométrica, de carbohidratos

aprovechables en las algas *Ulva* sp y *Chaetomorpha* sp para la producción de etanol que

funcione como biocombustible, por el método de la antrona. *Revista de Investigación*,

41(90), 053–066.

Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., & Wang, J. (2012). Biodiesel production from algae

oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource Technology*,

111, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.033>

Chia, M. A., Lombardi, A. T., & Melão, M. da G. G. (2013). Growth and biochemical

composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais Da Academia*

Brasileira de Ciencias, 85(4), 1427–1438. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., & Das, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, *101*(9), 3097–3105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.026>
- Cho, H. S., Oh, Y. K., Park, S. C., Lee, J. W., & Park, J. Y. (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, *54*, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.08.031>
- Choi, H. J. (2016). Parametric study of brewery wastewater effluent treatment using *Chlorella vulgaris* microalgae. *Environmental Engineering Research*, *21*(4), 401–408. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.024>
- Choi, W. Y., Kim, G. V., Lee, S. Y., & Lee, H. Y. (2014). Biodiesel production from *Scenedesmus* sp. through optimized in situ acidic transesterification process. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *28*(3), 367–374. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2013.1902>
- Cuello, M. C., Gori, J. I., Moheimani, N. R., & Chamorro, E. R. (2017). Producción de Compuestos Orgánicos de Valor Comercial a partir de la Biomasa Microalgal de *Scenedesmus Dimorphus*. *Revista Tecnología y Ciencia*, *30*(2), 281–289.
- Dahmen-Ben Moussa, I., Maalej, A., Masmoudi, M. A., Feki, F., Choura, S., Baccar, N., Jelail, L., Karray, F., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2021). Effect of olive mill wastewaters on *Scenedesmus* sp. growth, metabolism and polyphenols removal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(13), 5508–5519. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11200>
- Dejode Tanzi, C., Abert Vian, M., & Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource*

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

Technology, 134, 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.168>

Dos Santos, R. R., Moreira, D. M., Kunigami, C. N., Aranda, D. A. G., & Teixeira, C. M. L.

L. (2015). Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 95–99.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.015>

Ebrahimian, A., Kariminia, H. R., & Vosoughi, M. (2014). Lipid production in mixotrophic

cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, 71, 502–508.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.05.031>

Farooq, W., Lee, Y. C., Ryu, B. G., Kim, B. H., Kim, H. S., Choi, Y. E., & Yang, J. W.

(2013). Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, 132,

230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.034>

Farzandi, R., Nayebzaheh, H., Hokmabadi, M., & Seghatoleslami, N. (2020). Optimization of

Biodiesel Production Conditions Using *Chlorella vulgaris* Microalgae Cultivated in Different Culture Medium: Statistical Analysis. *Iranian Journal of Energy and*

Environment, 11(3), 212–220. <https://doi.org/10.5829/ijee.2020.11.03.06>

Fazal, T., Rehman, M. S. U., Javed, F., Akhtar, M., Mushtaq, A., Hafeez, A., Alaud Din, A.,

Iqbal, J., Rashid, N., & Rehman, F. (2021). Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*).

Chemosphere, 281(April), 130758. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130758>

Ferreira, A., Marques, P., Ribeiro, B., Assemany, P., de Mendonça, H. V., Barata, A.,

Oliveira, A. C., Reis, A., Pinheiro, H. M., & Gouveia, L. (2018). Combining

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, 164(December 2017), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.007>

Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P. A. S. S., Ferreira, A. F., Dias, A. P., Pinheiro, H. M., Reis, A., & Gouveia, L. (2017). *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. *Journal of Cleaner Production*, 165, 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.232>

Ganesan, R., Manigandan, S., Samuel, M. S., Shanmuganathan, R., Brindhadevi, K., Lan Chi, N. T., Duc, P. A., & Pugazhendhi, A. (2020). A review on prospective production of biofuel from microalgae. *Biotechnology Reports*, 27, e00509. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00509>

Gómez-luna, L. (2021). *Efecto del pH sobre el crecimiento y viabilidad celular de una cepa local de Chlorella vulgaris Beijerinck* Effect of pH over growth and cellular viability of *Chlorella vulgaris* Beijerinck local strain. 41(2), 252–276.

Hadrich, B., Akremi, I., Dammak, M., Barkallah, M., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2018). Optimization of lipids' ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z>

Han, X., Hu, X., Yin, Q., Li, S., & Song, C. (2021). Intensification of brewery wastewater purification integrated with CO₂fixation via microalgae co-cultivation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105710. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105710>

Herrera, K. (2021). *Obtención de lípidos a partir de biomasa cultivada en agua residual de*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

origen porcino (Issue c) [Universidad Internacional SEK].

<http://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4093>

- Ido, A. L., de Luna, M. D. G., Capareda, S. C., Maglinao, A. L., & Nam, H. (2018). Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction. *Energy*, *157*, 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.171>
- Jeswani, H. K., Chilvers, A., & Azapagic, A. (2020). Environmental sustainability of biofuels: A review: Environmental sustainability of biofuels. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *476*(2243). <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>
- Jordanov, D. I., Dimitrov, Y. K., Petkov, P. S. T., & Ivanov, S. K. (2007). Biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Oxidation Communications*, *30*(2), 300–305.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kialashaki, M., Mahdavi, M. A., & Gheshlaghi, R. (2019). Improved transesterification conditions for production of clean fuel from municipal wastewater microalgae feedstock. *Journal of Cleaner Production*, *241*, 118388. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118388>
- Kim, G. Y., Yun, Y. M., Shin, H. S., Kim, H. S., & Han, J. I. (2015). *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

production. *Bioresource Technology*, 196, 235–240.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.091>

Lai, Y. J. S., Francesco, F. De, Aguinaga, A., Parameswaran, P., & Rittmann, B. E. (2016).

Improving lipid recovery from *Scenedesmus* wet biomass by surfactant-assisted disruption. *Green Chemistry*, 18(5), 1319–1326. <https://doi.org/10.1039/c5gc02159f>

Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten*, 62, 31–38.

Lois-Milevicich, J., Casá, N., Alvarez, P., Mateucci, R., Busto, V., & de Escalada Pla, M.

(2020). *Chlorella vulgaris* biomass production using brewery wastewater with high chemical oxygen demand. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 2773–2783.

<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02163-8>

MAATE. (2011). Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes : Recurso Agua.

TULAS Texto Unificado de Legislación Secundaria Del Ministerio Del Ambiente, 8–9.

Method, D. (1900). *organic carbon CA.pdf*. 1–8.

Method, P. D. (1900). *Nitrogen , Total*. 1–8.

Morales, E., Macías, D., García, L., Loor, Y., & Plúas, L. (2019). Efecto de la salinidad y pH en la composición bioquímica de la microalga *Scenedesmus* sp. en cultivos discontinuos.

Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales, 13(1), 50–56.

<https://doi.org/10.53591/cna.v13i1.352>

Musa, M., Ayoko, G. A., Ward, A., Rösch, C., Brown, R. J., & Rainey, T. J. (2019). Factors

Affecting Microalgae Production for Biofuels and the Potentials of Chemometric

Methods in Assessing and Optimizing Productivity. *Cells*, 8(8).

<https://doi.org/10.3390/cells8080851>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

- Nagi, M., He, M., Li, D., Gebreluel, T., Cheng, B., & Wang, C. (2020). Utilization of tannery wastewater for biofuel production: New insights on microalgae growth and biomass production. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57120-4>
- Navarro-López, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Gabriel Acién, F., & Gouveia, L. (2020). Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, *25*(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25030664>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, *45*(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pérez, M., Quishpi, J., Pauta, G., León, F., Cisneros, J., Pinos, V., & Alvarado, A. (2018). Comparación de las eficiencias de recuperación de lípidos de las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* obtenidas con diferentes disolventes. *Maskana*, *9*(2), 27–34. <https://doi.org/10.18537/mskn.09.02.04>
- Persulfate, A., & Method, D. (n.d.). *Phosphorus*, *Total*. 1–8.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *26*(3), 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>
- Qin, L., Shu, Q., Wang, Z., Shang, C., Zhu, S., Xu, J., Li, R., Zhu, L., & Yuan, Z. (2014). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(2), 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0576-5>
- Ramírez, M. E., & Chávez Norma, J. J. (2012). Biodiesel , un combustible renovable- Biodiesel , a renewable fuel. *Investigación y Ciencia*, *55*, 1–9.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.uaa.mx%2Finvestigacion%2Frevista%2Farchivo%2Frevista55%2FArticulo%25208.pdf&ei=0-pTVOeaAoWmNpeGg-AI&usg=AFQjCNHUoltc56eDOoNtVOKj-kx_TTc4Ow&

Ramos, F. D., & Villar, M. A. (2016). ¿De qué se trata? ¿Qué son los biocombustibles y qué lugar ocupan en el panorama energético argentino y mundial? *Universidad Nacional Del Sur-Conicet*, 25, 69–73.

http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/25791/CONICET_Digital_Nro.cf291889-a370-4b7a-915b-4de3e1058c97_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Salazar Pérez, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Universidad de Piura*, 145.

Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., & Rodríguez, R. (2020). Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. *Renewable Energy*, 146, 188–195.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.148>

Schroeder, L., Scherer, M. D., Balmant, W., Vargas, J. V. C., & Mariano, A. B. (2015).

Scenedesmus sp. PRODUCED IN PILOT SCALE. 14(1), 22–33.

Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A.

G. (2010). Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Current Opinion in*

Biotechnology, 21(3), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>

Serrano Bermúdez, L. M., Ramírez Landínez, D. M., Sierra Sáenz, E. R., Scott Carvajal, O.

M., Álvarez Sierra, C. A., Torres Parra, J. M., Narváez Rincón, P. C., & Godoy Silva, R.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

- D. (2011). Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella Vulgaris* LAUN 0019. *Iteckne*, 8(1).
<https://doi.org/10.15332/iteckne.v8i1.257>
- Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., & Patel, A. (2016). Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. *3 Biotech*, 6(2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0434-6>
- Shen, X. F., Chu, F. F., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2015). Biosynthesis of high yield fatty acids from *Chlorella vulgaris* NIES-227 under nitrogen starvation stress during heterotrophic cultivation. *Water Research*, 81, 294–300.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.003>
- Shin, H. Y., Ryu, J. H., Bae, S. Y., Crofcheck, C., & Crocker, M. (2014). Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. *Fuel*, 130(April), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.023>
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499–508.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Subramaniam, V., Subashchandrabose, S. R., Ganeshkumar, V., Thavamani, P., Chen, Z., Naidu, R., & Megharaj, M. (2016). Cultivation of *Chlorella* on brewery wastewater and nano-particle biosynthesis by its biomass. *Bioresource Technology*, 211, 698–703.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.154>
- Urribarrí, A., Zabala, A., Sánchez, J., Arenas, E., Chandler, C., Rincón, M., González, E., & Mazzarri, C. A. (2014). Evaluación del potencial de la borra de café como materia prima para la producción de biodiesel Evaluation of the Potential for Used Coffee Grounds as

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Raw Material for Biodiesel Production. *Multiciencias*, 14(2), 129–139.

<http://www.redalyc.org/pdf/904/90432601006.pdf>

Vélez Tamayo, M. J. (2012). Estudio sobre el Modelado y Control de las Condiciones Óptimas de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores para Producción de Biodiésel. *Universidad De Almeria*, 56.

Vieira Viegas, C., Chenard Díaz, G., Reyes Cruz, Y., & Bacellar Mendes, L. B. (2020). Characterization of the Lipid Components in *Desmodesmus* and *Scenedesmus* Strains: Lipid Content, Lipid Classes and Fatty Acid Profile. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2103–2121.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1112148>

Wang, M., Wu, Y., Li, B., Dong, R., Lu, H., Zhou, H., & Cao, W. (2015). Pretreatment of poultry manure anaerobic-digested effluents by electrolysis, centrifugation and autoclaving process for *Chlorella vulgaris* growth and pollutants removal. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(7), 837–843.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2014.963695>

Wu, J. Y., Lay, C. H., Chen, C. C., & Wu, S. Y. (2017). Lipid accumulating microalgae cultivation in textile wastewater: Environmental parameters optimization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 79, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.02.017>

Wu, S., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., & Chen, W. (2017). Optimization of an effective method for the conversion of crude algal lipids into biodiesel. *Fuel*, 197, 467–473.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.02.040>

Xin, L., Hong-ying, H., & Jia, Y. (2010). Lipid accumulation and nutrient removal properties

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, 27(1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.11.006>

Yang, L., Tan, X., Li, D., Chu, H., Zhou, X., Zhang, Y., & Yu, H. (2015). Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater. *Bioresource Technology*, 181, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.043>

Yang, Y. H., Klinthong, W., & Tan, C. S. (2015). Optimization of continuous lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by CO₂-expanded methanol for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 198, 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.076>

Ye, S., Gao, L., Zhao, J., An, M., Wu, H., & Li, M. (2020). Simultaneous wastewater treatment and lipid production by *Scenedesmus* sp. HXY2. *Bioresource Technology*, 302(November 2019), 122903. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122903>

Yirgu, Z., Leta, S., Hussen, A., & Khan, M. M. (2020). Nutrient removal and carbohydrate production potential of indigenous *Scenedesmus* sp. grown in anaerobically digested brewery wastewater. *Environmental Systems Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40068-020-00201-5>

Yirgu, Z., Leta, S., Hussen, A., Khan, M. M., & Aragaw, T. (2021). Optimization of microwave-assisted carbohydrate extraction from indigenous *Scenedesmus* sp. grown in brewery effluent using response surface methodology. *Heliyon*, 7(5), e07115. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07115>

Ynga Huamán, G. (2011). “*Cultivo Masivo de Microalgas en Biorreactores Verticales.*” 61.

Yusoff, M. F. M., Xu, X., & Guo, Z. (2014). Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: A review on processing and production requirements. *JAACS*,

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

Journal of the American Oil Chemists' Society, 91(4), 525–531.

<https://doi.org/10.1007/s11746-014-2443-0>

Zheng, H., Liu, M., Lu, Q., Wu, X., Ma, Y., Cheng, Y., Addy, M., Liu, Y., & Ruan, R.

(2018). Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. *Bioresource Technology*, 249, 479–486.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.057>

Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., Liu, Y., Chen, P., & Ruan, R. (2012).

A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*, 110, 448–455.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.063>

Zhou, X., Jin, W., Tu, R., Guo, Q., Han, S. fang, Chen, C., Wang, Q., Liu, W., Jensen, P. D.,

& Wang, Q. (2019). Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. *Journal of Cleaner Production*,

221, 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.260>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

10. ANEXOS

Anexo A

Tabla 4: Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivada en agua residual de cerveza durante 14 y 12 días respectivamente. Conteo celular (cel/mL), Absorbancia a una longitud de onda de 680 nm y Peso seco (g/L).

Crecimiento celular						
Días	<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Scenedesmus sp</i>		
	Concentración celular (cel/mL)	Absorbancia (680 nm)	Peso seco (g/L)	Concentración celular (cel/mL)	Absorbancia (680 nm)	Peso seco (g/L)
0	2,60E+06 ± 5,52E+04	0,422 ± 0,001	0,0006 ± 8,49E-04	1,09E+06 ± 1,22E+05	0,402 ± 0,011	0,0013 ± 1,41E-04
1	7,11E+05 ± 5,52E+04	0,468 ± 0,003	0,0014 ± 4,95E-04	4,59E+06 ± 1,10E+04	0,889 ± 0,012	0,0019 ± 2,12E-04
2	7,34E+05 ± 2,21E+04	0,822 ± 0,020	0,0017 ± 4,24E-04	5,45E+06 ± 4,42E+04	1,070 ± 0,017	0,0017 ± 0
3	2,93E+05 ± 7,73E+03	0,989 ± 0,014	0,0028 ± 9,19E-04	5,73E+06 ± 4,42E+04	1,074 ± 0,004	0,0014 ± 7,85E-17
4	1,00E+05 ± 4,42E+03	1,012 ± 0,005	0,0033 ± 5,66E-04	5,71E+06 ± 1,10E+04	1,064 ± 0,009	0,0010 ± 4,24E-04
5	3,94E+05 ± 6,63E+03	1,073 ± 0,057	0,0031 ± 1,27E-04	6,30E+06 ± 1,31E+06	1,085 ± 0,004	0,0009 ± 2,12E-04
6	9,15E+05 ± 1,05E+06	1,101 ± 0,011	0,0032 ± 1,41E-04	6,89E+06 ± 6,85E+05	1,091 ± 0,007	0,0042 ± 1,06E-03
7	1,27E+06 ± 8,84E+04	1,100 ± 0,003	0,0039 ± 9,90E-04	7,53E+06 ± 2,21E+04	1,124 ± 0,006	0,0046 ± 1,41E-04
8	2,02E+06 ± 3,31E+04	1,110 ± 0,011	0,0089 ± 9,19E-04	7,63E+06 ± 3,31E+04	1,085 ± 0,008	0,0050 ± 4,95E-04
9	2,87E+06 ± 5,52E+04	1,098 ± 0,023	0,0096 ± 5,66E-04	6,73E+06 ± 1,22E+05	1,125 ± 0,008	0,0054 ± 7,07E-05
10	3,09E+06 ± 1,10E+04	1,050 ± 0,005	0,0099 ± 3,54E-04	6,59E+06 ± 1,10E+04	1,162 ± 0,034	0,0061 ± 3,54E-04
11	3,55E+06 ± 7,73E+04	1,066 ± 0,023	0,0091 ± 7,07E-05	5,67E+06 ± 2,21E+04	1,257 ± 0,005	0,0067 ± 4,42E-04
12	3,81E+06 ± 1,77E+05	1,065 ± 0,007	0,0091 ± 8,49E-04	5,66E+06 ± 6,63E+04	1,246 ± 0,005	0,0070 ± 1,41E-04
13	3,90E+06 ± 1,10E+04	1,047 ± 0,013	0,0090 ± 6,36E-04	S/N	S/N	S/N
14	3,92E+06 ± 1,77E+05	1,008 ± 0,003	0,0089 ± 4,24E-04	S/N	S/N	S/N

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Anexo B

Tabla 5: Remoción de nutrientes de agua residual de cerveza con *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivada durante 14 y 12 días. Nitrógeno total (g/L N), Fósforo total (g/L PO₄³⁻) y Carbono Total (g/L C).

Crecimiento celular						
Días	<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Scenedesmus sp</i>		
	Nitrógeno total (g/L N)	Fósforo total (g/L PO ₄ ³⁻)	Carbono total (g/L C)	Nitrógeno total (g/L N)	Fósforo total (g/L PO ₄ ³⁻)	Carbono total (g/L C)
0	131 ± 4,95	511,4 ± 11,17	868 ± 1,41	45,5 ± 1,41	154,2 ± 4,10	864,5 ± 0,71
1	120 ± 9,90	499,5 ± 9,26	844,5 ± 2,12	38 ± 2,83	120,2 ± 6,79	806,5 ± 7,78
2	108 ± 4,24	408,4 ± 3,68	835,5 ± 4,95	31,5 ± 1,41	112,7 ± 3,96	758,5 ± 14,85
3	92 ± 2,83	241,5 ± 3,25	811,5 ± 7,78	28 ± 0,71	92,3 ± 17,11	709 ± 1,41
4	88 ± 1,41	240,4 ± 10,18	766 ± 1,41	26,5 ± 0	64,7 ± 0,78	663,5 ± 4,95
5	84,5 ± 2,12	227,8 ± 6,86	743,5 ± 3,54	25,5 ± 1,41	60,3 ± 4,95	597 ± 1,41
6	82,5 ± 0,71	221,5 ± 9,97	732,5 ± 7,78	22 ± 0,71	58,9 ± 5,52	476,5 ± 12,02
7	82 ± 2,83	211,4 ± 5,23	655,5 ± 0,71	17 ± 1,41	57,7 ± 0,28	331 ± 11,31
8	75,5 ± 2,12	206,5 ± 2,81	610,5 ± 12,02	14 ± 0,71	56,1 ± 1,63	309,5 ± 12,02
9	67,5 ± 2,12	181,9 ± 0,92	543 ± 1,41	12 ± 0	55,9 ± 0,71	289,5 ± 3,54
10	63 ± 1,41	169,4 ± 4,31	522 ± 1,41	12 ± 1,41	50,2 ± 2,69	285,5 ± 7,78
11	59 ± 0	139,1 ± 9,69	484 ± 1,41	11 ± 0	45,9 ± 2,05	247 ± 4,24
12	58,5 ± 0,71	129,8 ± 1,63	426 ± 2,83	11 ± 1,41	43,7 ± 0,71	189,5 ± 2,12
13	53 ± 5,66	117,4 ± 1,48	416 ± 4,24	S/N	S/N	S/N
14	52 ± 5,66	112,2 ± 6,22	410 ± 7,07	S/N	S/N	S/N

Anexo C

Tabla 6: Extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda, seca y ácidos grasos libres (AGL) de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp*.

Extracción de lípidos y AGL						
Solventes	<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Scenedesmus sp</i>		
	Húmedo (%)	Seco (%)	AGL (%)	Húmedo (%)	Seco (%)	AGL (%)
Metilciclohexano	3,28	11,86	11,10	1,25	9,86	14,95
Acetato de etilo	0,71	2,44	10,05	0,30	2,92	19,20
Etanol	4,71	13,42	37,81	2,50	11,11	38,61
Cloroformo metanol (1:2)	5,26	17,59	8,52	2,72	19,07	15,49
Hexano	4,79	10,67	9,80	1,21	8,48	12,17
Metanol	4,49	16,44	38,52	2,37	10,69	41,33

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL

Anexo D

Tabla 7: Extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) a partir de lípidos extraídos usando ácido sulfúrico y resina comercial CT-256 de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*

Extracción de FAMES directa e indirecta					
Solventes		<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus sp</i>	
		FAMES (%)		FAMES (%)	
		CT-269	H ₂ SO ₄	CT-269	H ₂ SO ₄
Directo		20,79	46,01	14,62	38,38
Hexano	L. húmedos	6,50	45,10	S/N	S/N
	L. seco	30,50	45,50	30,00	44,65
Metanol	L. húmedos	32,00	43,60	35,50	42,90
	L. seco	32,50	52,60	39,50	35,85
	AGL	20,50	45,75	75,00	46,30
Etanol	L. húmedos	31,00	43,70	62,50	40,50
	L. seco	44,00	36,05	30,00	45,45
Metilciclohexano	L. húmedos	22,00	43,25	13,00	36,55
	L. seco	46,00	47,25	76,00	56,15
Cloroformo: metanol (1:2)	L. húmedos	23,00	41,90	67,00	40,25
	L. seco	43,00	42,50	44,50	40,05
Acetato de etilo	L. húmedos	17,50	47,65	22,50	40,05
	L. seco	S/N	38,15	76,00	46,40

Anexo E

Tabla 5: Productividad de lípidos (mg/l*d) con biomasa seca de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en 40 l de agua residual de cerveza por 14 y 12 días.

Solvente extractor	Productividad (mg/l*d)	
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus sp</i>
Metilciclohexano	0.106±0.0359	0.103±0.0009
Acetato de etilo	0.022±0.0035	0.031±0.0016
Etanol	0.120±0.0850	0.117±0.0043
Cloroformo metanol (1:2)	0.158±0.0141	0.199±0.0539
Hexano	0.096±0.0004	0.090±0.0164
Metanol	0.149±0.1052	0.114±0.0041

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA
EN AGUA RESIDUAL DE CERVEZA ARTESANAL**

Anexo F

Tabla 8: Productividad de FAMES (mg/l*d) con biomasa seca de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* cultivadas en 40 l de agua residual de cerveza por 14 y 12 días.

Solvente	Productividad (mg/l*d)			
	Chlorella vulgaris		Scenedesmus sp	
	H ₂ SO ₄	Resina	H ₂ SO ₄	Resina
Biomasa seca directa	0,839±0.0226	0,038±0.0021	0,959±0.6025	0,033±0.0221
Hexano	0,081±0.0018	0,005±0.0044	0,093±0.0063	0,006±0.0003
Metanol	0,094±0.0010	0,006±0.0029	0,075±0.0004	0,008±0.0013
Etanol	0,064±0.0102	0,008±0.0013	0,095±0.0087	0,006±0.0027
Metilciclohexano	0,084±0.0029	0,006±0.0048	0,117±0.0075	0,016±0.0009
Cloroformo metanol (1:2)	0,076±0.0038	0,008±0.0000	0,083±0.0078	0,009±0.0025
Acetato de etilo	0,068±0.0032	0,000±0.0000	0,097±0.0035	0,016±0.0012
AGL (metanol)	0,082±0.0004	0,006±0.0019	0,096±0.0144	0,016±0.0032