

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**



**FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA”**

Realizado por:

**SAMUEL ANTONIO ARROYO CEVALLOS**

Directo del proyecto:

**PhD (c) Johanna Medrano Barboza**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA**

Quito, 10 de marzo de 2023

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**DECLARATORIA JURAMENTADA**

Yo, SAMUEL ANTONIO ARROYO CEVALLOS, con cédula de identidad # 1751324623, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a 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.



**FIRMA**

**1751324623**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA”**

Realizado por:

**SAMUEL ANTONIO ARROYO CEVALLOS**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

ha sido dirigido por la profesora

**JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Johanna Lucía Medrano Barboza', is written over a faint circular stamp.

**FIRMA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**PhD. ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO**

**PhD (c) SUSANA ELIZABETH CHAMORRO ARIAS**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



**FIRMA**



**FIRMA**

Quito, 10 de marzo de 2023

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

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

Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

**Energías, Ambiente y Biotecnología**

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada en primer lugar a Dios, quien me ha dado las fuerzas para seguir adelante en los momentos más difíciles, dándome la inteligencia la sabiduría para poder culminar con éxito mi carrera.

A mis padres Ernesto Arroyo y Rocío Cevallos, quienes han sido el pilar fundamental en estos años dándome ejemplo de honestidad, responsabilidad, humildad, superación, apoyándome y creyendo siempre en mí.

A mi hermano Daniel por su motivación diaria de seguir adelante, por su compañía en las noches de desvelo. A mi tía Lucy quien ha sido como una segunda madre siempre con sus consejos a tiempo. A mis abuelos que con su guía y experiencia me han motivado a culminar con éxito mi carrera y a toda mi familia en general, de quienes de una u otra manera he sentido su respaldo.

Y quiero terminar agradeciendo a mis amigos y compañeros de laboratorio Thais Flor, Alisson Vega, Micaela Espinosa, Luis Guasumba e Israel Valle quienes me apoyaron en el transcurso del proyecto.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento se dirige a mis profesores quienes han forjado mi camino para llegar hasta este punto de mi carrera, quiero agradecer especialmente a la profesora Johanna Medrano, quien me involucró en esta profesión, me apoyó y guió durante todo el proceso con sus conocimientos y consejos.

Agradezco a la universidad y a todo su personal por permitirme crecer en mi profesión con todo el aprendizaje brindado.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**Para someter a:**

**To be submitted:**

**Samuel Antonio Arroyo Cevallos<sup>1</sup>, Johanna Medrano Barboza<sup>1\*</sup>,**

**Alberto Alejandro Aguirre Bravo<sup>1</sup>, Susana Elizabeth Chamorro Arias<sup>1</sup>**

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA”**

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

10 de marzo de 2023

\*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](mailto:johanna.medrano@uisek.edu.ec)

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

## **RESUMEN**

Las aguas residuales de las industrias poseen varios químicos que son perjudiciales para los humanos; sin embargo, pueden ser una fuente nutritiva para las microalgas, microorganismos, que tienen la habilidad de hacer fotosíntesis asimilando el dióxido de carbono incluso mejor que las plantas terrestres, capaces de remediar este tipo de aguas residuales y además pueden generar biomasa con un contenido lipídico de interés para la producción de biocombustibles. En la presente investigación se usaron las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. cultivadas en consorcio en agua residual de una industria cervecera para determinar sus parámetros fisicoquímicos, crecimiento celular y su rendimiento lipídico. Se analizó el crecimiento celular para la obtención de biomasa, de lo cual se obtuvo 0.586 g/L de biomasa total y una productividad específica de 0.077 d<sup>-1</sup>. Se analizaron parámetros fisicoquímicos durante el periodo de cultivo, logrando un porcentaje de remoción de 36.23% para el carbono orgánico total (COT), 90.12% para nitrógeno total (NT) y 89.24% de fósforo total (PT). La extracción de lípidos arrojó un valor de 25.18% con acetato de etilo como mejor solvente extractor, para los ácidos grasos libres (AGL) se obtuvo un 58.25% con etanol, y en la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se obtuvo un 78.5% con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) y metilciclohexano. Este estudio demostró la eficacia que presenta el consorcio respecto a los análisis realizados de FAME, además presentó un buen porcentaje de remoción, lo que hace que sea una buena opción para biorremediación de aguas residuales.

**Palabras claves:** *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., consorcio, agua residual de cerveza, lípidos.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**SUMMARY**

Industrial wastewater contains several chemicals that are harmful to humans; however, it can be a nutrient source for microalgae, microorganisms that can photosynthesize and assimilate carbon dioxide even better than terrestrial plants, they are also capable of remediating this type of wastewater and generate biomass with a lipid content of interest for the production of biofuels. In the present investigation, the species *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. grown in consortium in wastewater from a brewery industry were used to determine their physicochemical parameters, cell growth and lipid yield. Cell growth was analyzed to obtain biomass, from which 0.586 g/L of total biomass and a specific productivity of 0.077 d<sup>-1</sup> were obtained. Physicochemical parameters were analyzed during the cultivation period, achieving a removal percentage of 36.23% for total organic carbon (TOC), 90.12% for total nitrogen (TN) and 89.24% for total phosphorus (TP). Lipid extraction yielded a value of 25.18% with ethyl acetate as the best extracting solvent, for free fatty acids (FFA) 58.25% was obtained with ethanol, and in the extraction of fatty acid methyl esters (FAME) 78.5% was obtained with the chloroform:methanol (1:2) mixture and methylcyclohexane. This study demonstrated the efficacy of the consortium with respect to the analysis of FAME and showed a good percentage of removal, which makes it a good option for bioremediation of wastewater.

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

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

## **1. INTRODUCCIÓN**

Con la llegada de la revolución industrial uno de los principales cambios fue la utilización de combustibles fósiles para la obtención de energía térmica y eléctrica y así cubrir las necesidades industriales y domésticas (Fogelbach et al., 2020).

Durante millones de años la composición natural de los gases atmosféricos ha permitido la biodiversidad y la evolución de todas las formas de vida, sin embargo, con la modificación de los gases atmosféricos, los niveles de contaminación ambiental están llegando a su límite de capacidad de autodepuración natural (Fogelbach et al., 2020).

La disminución de reservas petroleras y la contaminación ambiental actual causada por la quema de combustibles fósiles, cada vez es más grave; por lo que actualmente es muy importante buscar combustibles alternativos, que disminuyan el impacto ambiental (Fernández-Linares et al., 2012). Gracias a diferentes estudios se ha demostrado que algunos alimentos (aceite de palma y palma) tienen una alta capacidad para producir biocombustibles; sin embargo, existe una problemática por la competencia directa con el uso de recursos para la alimentación humana (Rodríguez Núñez, 2017).

Al presente, la energía renovable contribuye muy por debajo de la capacidad esperada para la producción total de energía global, la misma solo satisface un 20% de la demanda mundial de energía (Musa et al., 2019). Si se logra aprovechar de manera eficiente, puede tener el potencial para satisfacer la demanda mundial de electricidad y se está adaptando cada vez más para su uso en todo el mundo (Musa et al., 2019).

Actualmente hay diversos tipos de energías renovables entre las cuales se encuentran:

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

Hidroelectricidad: Principal fuente de energía renovable en el mundo, de los cuales una alternativa de creciente interés son pequeños proyectos hidroeléctricos que evitan muchos de los problemas de los barrajes de mayor dimensión (Machado, C. 2010).

Energía solar: Fuente de energía que tiene varias ventajas y desventajas en cuanto a su aprovechamiento. Entre sus ventajas encontramos principalmente su naturaleza inagotable, renovable y su libre utilización. Entre sus dificultades encontramos su naturaleza intermitente, variabilidad fuera del control humano y su baja densidad de potencia (Alarcón et al., 2021).

Energía eólica: Fuente de energía que se obtiene a través del viento, se utilizan generadores eólicos los cuales adquieren energía de la circulación del aire que pasa a través de sus aspas. Se utilizan a nivel mundial para la generación de energía, siendo así los más usados (Fula, J. G., & Vilorio, A. 2015).

Energía geotérmica: Fuente de energía obtenida de una porción del calor de la Tierra, la cual se puede recuperar y explotar por el hombre (Alvarado et al., 2021).

Energía mareomotriz: Se obtiene de los mares y océanos, podemos encontrar varios tipos de aprovechamiento entre los cuales están, la energía de las corrientes, la energía maremotérmica y la energía undimotriz (González, J. R. Q., & González, L. E. Q. (2015)).

Bioenergía: Energía que se obtiene a partir de biomasa, la cual es producida por las plantas al fijar la luz, agua y dióxido de carbono mediante la fotosíntesis (Corso, H. L. 2022).

Los biocombustibles son una gran alternativa para reemplazar los combustibles derivados del petróleo, ya que tienen grandes ventajas en cuanto a biodegradabilidad y

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

mínima toxicidad, además que produce menores emisiones de sulfatos, compuestos aromáticos, dióxido de carbono, monóxido de carbono y humo (Rodríguez Núñez, 2017).

Existen diferentes formas de generar biocombustibles por lo que se ha realizado una clasificación en función a la materia prima de la que provengan, la primera generación se obtiene a partir de cultivos de granos, de los cuales se han identificado unos 350 cultivos oleaginosos como posibles fuentes para la producción de biodiesel. La segunda generación proviene de los residuos de materiales no alimentarios como los residuos postcosecha, la tercera generación consiste en emplear como materia prima cultivos bioenergéticos especialmente diseñados o adaptados para mejorar la conversión de la biomasa a biocombustibles; por último, los de cuarta generación encabezado por microorganismos (genéticamente modificados o no) para mejorar la eficiencia en la captación y almacenamiento de CO<sub>2</sub> (Espinoza, G. T. (2021)).

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontas y eucariotas, que se localizan en diferentes hábitats como aguas marinas, dulces, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Vélez Tamayo, M. J. (2014)). Además, son consideradas como las responsables de la producción del 50% de oxígeno y de la fijación del 50% de carbono en todo el mundo (Vélez Tamayo, M. J. (2014)). Poseen un gran potencial en el tratamiento de aguas residuales, ya que tienen una capacidad ficorremediadora, la cual consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso (Pilco et al., 2021).

El uso de microalgas para la producción de biodiesel ha sido considerado desde hace unos 30 años como una opción prometedora, debido a que presentan mayor eficiencia

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

fotosintética, mayor eficacia en la asimilación de CO<sub>2</sub> y otros nutrientes en comparación con otras plantas, acumulan entre 20 y 80% de triglicéridos, no requieren tierras cultivables, tienen menor consumo de agua fresca y pueden cultivarse en aguas residuales (Fernández-Linares et al., 2012).

Actualmente el uso de biomasa de microalgas para obtener biocombustibles se ha mencionado como una fuente alternativa viable y rentable, el aceite de microalgas ha recibido una atención particular como materia prima para la producción de biocombustibles además de ser una fuente potencial para producir una variedad de productos químicos, farmacéuticos, alimentarios y cosméticos (Tejada Carbajal et al., 2020).

Un consorcio de microbiano se denomina como grupos de microorganismos diversos que tienen la capacidad de actuar de manera conjunta como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás (Ram et al., 2022).

Las microalgas han sido estudiadas ampliamente, estas investigaciones se han basado en el sistema de monocultivo, debido al objetivo de lograr una composición de biomasa pura y estable, sin embargo; mantener este sistema no es sencillo, ya que existen los microorganismos no deseados, como bacterias, hongos, protozoos y levaduras, que contaminan el cultivo de microalgas provocando el colapso del cultivo, pérdida de biorecursos, la baja de metabolitos y la baja calidad de la biomasa (Rashid et al., 2019). En los últimos años el co-cultivo de microorganismos ha surgido como alternativa a estos problemas, en este sistema diferentes especies de microalgas conviven para beneficiarse mutuamente, se ha revelado que este sistema proporciona protección contra los

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

microorganismos invasores, presentando una alta productividad de biomasa y una composición de biomasa versátil (Rashid et al., 2019).

Diversos estudios sustentan el uso de aguas residuales de origen industrial como medios de cultivo aptos para el crecimiento microalgal así como actividades de biorremediación de aguas; entre ellas destacan aguas residuales de origen municipal, de industria agropecuaria (cría y faenamiento de aves, vacas, cerdos), industrias lácteas, industria cervecera, etc. (Guasumba Anchundia, L. F. (2022)).

En Ecuador se conoce que los principales autores del mercado de cerveza son firmas industriales como Cervecería Nacional (CN) y Ambev Ecuador, las cuales poseen un 99.48% de participación y el 0.52% corresponde a la producción artesanal; para el año 2013, solo la CN registró ventas de 5.7 millones de hectolitros de cerveza (Noblecilla et al., 2017). Las aguas residuales de la industria cervecera se caracterizan por tener una elevada carga orgánica, concentraciones apreciables de sólidos en suspensión y un pH variable, también contiene un valor alto de nitrógeno gracias a las levaduras contenidas. Las aguas residuales de estas industrias son provenientes de la fabricación de la malta y la cerveza, así como la limpieza de los equipos, envases y de las instalaciones (Noblecilla, 2022).

Existe una falta de estudios previos respecto al crecimiento y obtención de lípidos a partir de las microalgas de las especies en consorcio *Chlorella vulgaris* identificada por primera vez por Beijerinck en 1890 y *Scenedesmus* sp identificada por primera vez por Meyen en 1829. cultivada en agua residual de la industria cervecera. Estos datos podrían ser útiles para futuras investigaciones que se enfoquen en la fabricación de biocombustibles de origen microalgal en el país, el cual se inició en el tema de los

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

biocombustibles en el año 2012, pero no ha tenido mayor progreso a la fecha (Preciado et al., 2022).

## **2. HIPÓTESIS**

El agua residual de la industria cervecera posee un contenido de nutrientes adecuado para que la biomasa obtenida de un consorcio de microalgas de las especies *C. vulgaris* y *S. sp.*, tenga un porcentaje de lípidos superior al 30% y de ácidos grasos libres superior al 80%, de modo que sus ésteres metílicos de ácidos grasos puedan emplearse en la producción de biodiésel a partir de la transesterificación de biomasa microalgal.

## **3. OBJETIVOS**

### **General.**

Evaluar el rendimiento de lípidos a partir de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua residual de la industria cervecera.

### **Específicos.**

1. Caracterizar el agua residual de industria cervecera mediante análisis fisicoquímicos para la determinación de su uso potencial como medio de cultivo de microalgas.
2. Analizar el crecimiento del consorcio en un fotobiorreactor para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos.
3. Caracterizar el agua residual postcosecha mediante análisis fisicoquímicos para la determinación de la remoción de nutrientes principales.

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

4. Evaluar la fracción lipídica de la biomasa cultivada mediante procesos de extracción de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos para la comprobación de su potencial de uso en la producción de biodiésel.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio.**

El área de estudio comprende al Distrito Metropolitano de Quito. El cultivo de la microalga con su respectiva agua se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK, en el campus de Carcelén.

### **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) hasta su cultivo (Guasumba Anchundia, L. F. (2022)).

- **Obtención del medio de cultivo.**

Para el estudio se recolectó únicamente 50 L de agua residual de cerveza de una fábrica de cerveza artesanal ubicada en Quito, Ecuador en el sector de Cumbayá.

### **Fase de laboratorio.**

- **Caracterización del agua residual**

Se recogieron 500 mL del agua residual de origen cervecero en una botella previamente esterilizada. Se analizó la concentración de macronutrientes (nitrógeno total, fósforo total, carbono orgánico total) con la ayuda de protocolos HATCH análogos al

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

método 1072 (HACH 2014a), 10127 (HACH 2014c) y 10128 (HACH 2014b), respectivamente.

- **Preparación de inculó:**

El consorcio conformado por las cepas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. se mantuvo en medio líquido Bold's Basal Medium (BBM); las réplicas se realizaron en proporción 1:10 y los inóculos se colocaron en botellas autoclavables de 1 L con conexiones de aireación continua de 4.2 L/min, en fotoperiodos de 12 horas a temperatura ambiente durante 7 días previo a la siembra.

- **Preparación de medio de cultivo:**

Conforme al protocolo de Qin et al., (2014), se prepararon 60 L del agua residual recolectada a una dilución 1:20, luego se esterilizó en autoclave a 121.5 °C durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, los restos de partículas sólidas se removieron con un filtro multicapas siguiendo la metodología propuesta por Wang et al., (2015).

- **Siembra del inculo en el fotobiorreactor:**

Se inculó el cultivo de microalgas con una proporción 1:10 en un fotobiorreactor de vidrio (71.3 cm de largo x 8.8 cm de ancho x 61 cm de alto) con una capacidad de 50 L la cual contenía 44.5 L de agua residual previamente tratada y filtrada a la cual se inculó un total de 5.5 litros de cultivo de consorcio. El fotobiorreactor se mantuvo en condiciones atmosféricas de Quito con aireación continua y control de temperatura 27±2 °C durante 13 días sin reposición de nutrientes.

# OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA

- **Determinación de crecimiento de microalgas.**

Se recolectaron 50 mL de muestras diariamente del fotobiorreactor durante 13 días. El crecimiento de los cultivos se determinó mediante densidad óptica con espectrofotometría, conteo celular y peso seco.

- Densidad Óptica

El crecimiento celular se determinó siguiendo el protocolo establecido por Arias (2013). Se midió por densidad óptica a través de espectrofotometría, la misma se realizó a 680 nm con un espectrofotómetro marca HACH 5000, con dicha longitud fue posible determinar la densidad óptica de las especies en consorcio.

- Conteo Celular

El conteo celular se realizó mediante el recuento de las células visualizadas en cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Leica a 40X usando un factor de dilución de 1:10 para que sea posible el conteo del consorcio y posteriormente se determinó la concentración mediante la Ecuación (1), siguiendo el protocolo propuesto de Bastidas (2011).

$$\text{Concentración celular } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{núm.células} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) * 10.000}{\text{núm.cuadros}} * \text{dilución} \quad (1)$$

- Peso Seco

El peso seco se realizó mediante la utilización de filtros de papel para análisis cualitativos con secado a 100 °C durante 24 h análogamente a la investigación de (Chia et al., 2013). Luego de las 24 horas, se puso el papel filtro a temperatura ambiente en un desecador durante 30 minutos para enfriarlo y con ayuda de una balanza analítica se pesó el papel sin muestra. Posteriormente se colocó 1 mL de muestra y se dejó secando a 60 °C por 24 horas. Luego de las 24 horas se pesó el filtro con la muestra y se determinó el peso seco con la Ecuación (2) por diferencia de pesos.

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

$$\text{Peso Seco} \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{(\text{filtro seco} + \text{muestra seca})(g) - \text{filtro inicial}(g)}{\text{volumen de muestra}(mL)} \quad (2)$$

La productividad total de biomasa obtenida se determinó de acuerdo con la Ecuación (3) utilizada por Guasumba (2022).

$$\text{Productividad total} = \frac{\text{Biomasa total}(g)}{\text{Volumen}(l) * \text{Tiempo}(d)} \quad (3)$$

- **Caracterización del agua residual de cerveza y análisis de parámetros fisicoquímicos (NT, CT, PT).**

Las muestras recogidas diariamente fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 5 min en una centrifuga marca Boeco C-28A. El sobrenadante se recolectó para el posterior análisis por triplicado de los parámetros fisicoquímicos del cultivo. Se utilizaron protocolos HACH para la determinación de los macronutrientes como Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (PT) y Carbono Orgánico Total (COT), análogos al método 1072 (HACH 2014a), 10127 (HACH 2014c) y 10128 (HACH 2014b), respectivamente. El porcentaje de remoción de nutrientes se calculó en base a la Ecuación (4) establecido por Eladel (2019), donde  $C_i$  es la concentración inicial del nutriente y  $C_F$  es la concentración final del mismo.

$$\% \text{Remoción Nutrientes} = \frac{(C_i - C_F)}{C_i} * 100\% \quad (4)$$

La caracterización del agua residual de cerveza se realizó con 4 litros del agua sin cultivar y con el sobrenadante obtenido concluidos los 13 días de cultivo a través de los siguientes métodos estandarizados expresados en el Anexo 1.

- **Cosecha y obtención de biomasa microalgal.**

Una vez culminados los 13 días de producción de biomasa, el fotobiorreactor se vació y el contenido se trasladó a los laboratorios de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas para centrifugar a 4000 rpm por 5 min en falcons de 50 mL, se reservaron 2 L

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

de sobrenadante y lo demás se desechó. Este procedimiento se realizó dos veces para remover el mayor contenido de agua. La biomasa húmeda se llevó a refrigeración de -4 °C. La obtención de biomasa seca se realizó con la ayuda de una estufa de convección forzada durante 5 h a 105 °C. La biomasa húmeda y seca se guardaron para los análisis posteriores.

- **Extracción de lípidos.**

La extracción de lípidos totales presentes en la biomasa húmeda y seca, se extrajeron de solventes orgánicos de grado HPLC, entre ellos: hexano, metanol, cloroformo: metanol (1:2), etanol, acetato de etilo y metilciclohexano, análogamente a los métodos de Hadrich et al. (2018) y Salazar Pérez (2012). Se determinó el porcentaje total de lípidos de cada solvente extractor por gravimetría de acuerdo con la Ecuación (5) establecido por Hadrich (2018) y Zhu (2016); en donde  $P_L$  es el peso del frasco con el contenido lipídico extraído y seco en gramos, y  $P_B$  es el peso de la biomasa microalgal seca o húmeda en gramos.

$$\text{Contenido lipídico}(\%) = \frac{P_L}{P_B} * 100\% \quad (5)$$

La productividad total volumétrica de lípidos se determinó de acuerdo con la Ecuación (6) definida por Guasumba (2022); en donde  $M_L$  es la masa de lípidos,  $V$  es el volumen del cultivo expresado en litros y  $(t)$  es el tiempo en días. Para la productividad específica de biomasa en base a la productividad volumétrica se usó la Ecuación (7).

$$\text{Productividad Total Volumétrica} \left( \frac{g}{L*d} \right) = \frac{M_L}{V*t} \quad (6)$$

$$\text{Productividad Específica Biomasa} = \frac{\text{Prod. Vol Biomasa} \left( \frac{g}{L*d} \right)}{\text{Conc. Biomasa} \left( \frac{g}{L} \right)} \quad (7)$$

- **Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL).**

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

La extracción de Ácidos Grasos Libres totales (AGL) presentes en la biomasa seca, consiste en la saponificación de biomasa con los solventes orgánicos mencionados anteriormente e hidróxido de potasio en un baño térmico a 60 °C por 4 horas a 700 rpm, mediante el protocolo de extracción de AGL de Dejoye, Abert, and Chemat (2013).

Posteriormente se realizó la purificación filtrando la muestra con una bomba al vacío y se ajustó el pH con HCl 1 M; lo siguiente fue colocar la muestra en un embudo de decantación en donde se observó la separación por fases, una compuesta por ácidos grasos (fase orgánica) y la otra compuesta por residuos contaminantes no lipídicos (fase inorgánica) de acuerdo con (Abedini Najafabadi et al., 2015).

El porcentaje lipídico de ácidos grasos se midió por gravimetría con la Ecuación (8) descrita por Guasumba (2022); donde  $T_1$  corresponde al peso del frasco vacío,  $T_2$  al peso del frasco con ácidos grasos libres y ( $W$ ) el peso inicial de biomasa utilizada para la extracción.

$$\%AGL = \left( \frac{T_2 - T_1}{W} \right) * 100 \quad (8)$$

- **Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME's):**

La extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos presentes en la biomasa seca y las grasas obtenidas anteriormente (lípidos y AGL's), se determinaron en tres procesos (directo, indirecto y de ácidos grasos libres) con un catalizador homogéneo ( $H_2SO_4$ ) y un catalizador ácido heterogéneo (resina comercial CT-269DR); con el siguiente procedimiento:

Se colocó dentro de cada reactor de vidrio una relación de (catalizador: solvente: biomasa o grasa), para el catalizador homogéneo es (1.74:30:10) y para el catalizador heterogéneo es (1.1:100:1). Se colocó en baño térmico a 90 °C por 4 horas a 400 rpm. Al terminar, la fase orgánica se filtró en un equipo Millipore y se agregó 2 mL al filtrado de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

una mezcla hexano:dietiléter (80:20) para eliminar impurezas. Luego se pasó a un embudo de decantación, se agitó y dejó reposar por 10 min para alcanzar la separación de fases. Finalmente se trasvasó la fase orgánica a un tubo falcon previamente pesado y se secó a 60 °C por 24 h, luego se pesó el recipiente con el producto seco. Se calculó el rendimiento a biodiesel en la Ecuación (9); donde se representa ( $T_2$ ) como los FAME extraídos, el frasco vacío como ( $T_1$ ) y la biomasa usada en gramos como ( $W$ ). Todos los tratamientos realizados se llevaron a cabo por triplicado para la disminución del error.

$$\%FAME = \left( \frac{T_2 - T_1}{W} \right) * 100 \quad (9)$$

- **Cromatografía por capa fina (Thin layer chromatography-TLC)**

Para la cromatografía se requirió una placa de gel de sílice de 40 x 80 mm de la marca ALUGRAM Xtra Sil de 0.2 mm de sílica gel, se colocó la placa sobre un papel absorbente y a 1 cm de la base se trazó una línea con un lápiz de grafito, se marcaron los tres puntos de ubicación para las muestras (estándar, lípidos de AGL y lípidos de FAME). Durante 30 minutos se mantuvo la placa en una estufa para su activación a 100 °C; pasado el tiempo se colocaron las muestras disueltas con 3  $\mu$ L de su propio solvente extractor y con un tubo capilar de 1.4 mm de diámetro se asentó en la placa. El estándar utilizado fue oleato de colesterol de la marca Sigma resuspendido con 1 mL de cloroformo por cada 100 mg del estándar. Se dejó reposar la placa sobre la fase móvil de cloroformo:metanol (1:2) en un frasco con tapa por 10 minutos y se reveló la corrida a través de vapores de yodo en un frasco con perlas de yodo y sílica gel por 10 minutos más, análogamente al protocolo de Cabrera (2016). La TLC se realizó con el mejor solvente extractor de AGL y FAME. El factor de retención ( $R_f$ ) se calculó con la Ecuación (10) mencionada por Rodríguez (2008) que relaciona la distancia recorrida en centímetros por la muestra

# OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA

dividida entre la distancia total recorrida por la fase móvil en centímetros. Todas las muestras se realizaron por triplicados y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (Y)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (X)}} \quad (10)$$

- **Análisis Estadísticos**

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 triplicado 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 ( $p < 0,05$ ).

## 3.RESULTADOS

### 3.1 Caracterización del medio de cultivo

En la tabla 1 observamos los valores correspondientes a los macronutrientes presentes en el agua residual de origen cervecero en comparación a los obtenidos en el medio BBM.

**Tabla 1.** Caracterización del agua residual de origen cervecero vs medio BBM mediante análisis fisicoquímicos

	AGUA CERVEZA	MEDIO BBM
NITRÓGENO TOTAL (mg/L)	129.59	262
FÓSFORO TOTAL (mg/L)	95.48	127.8

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

CARBONO ORGÁNICO TOTAL (mg/L)	929	4
-------------------------------------	-----	---

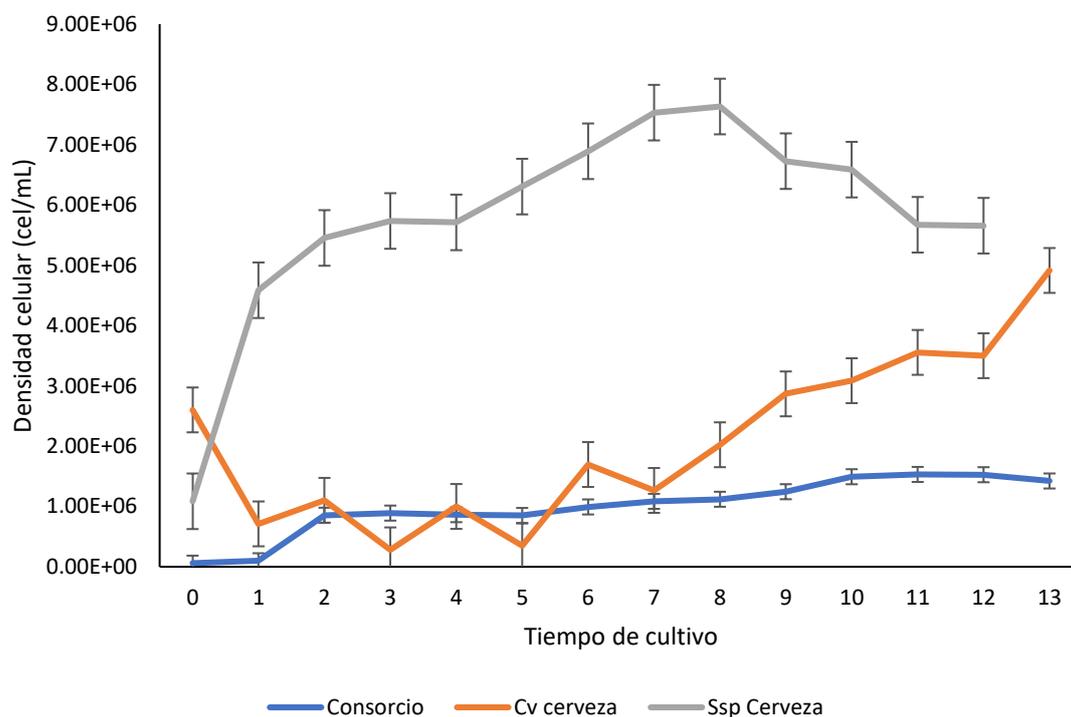
---

### 3.2 Determinación del crecimiento celular

- Densidad Celular

Se determinaron las curvas de crecimiento celular por día de las especies *Scenedesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, y el consorcio de estas, cultivadas en agua residual de cerveza artesanal por un periodo de 12 días para *C. vulgaris* y 13 días para *S. sp.* respectivamente; y de 13 días para las especies en consorcio como se muestra en la figura A. Se puede observar que los valores iniciales de concentración de *Chlorella vulgaris* arrojan un valor inicial de  $2.6 \cdot 10^6 \pm 5.25 \cdot 10^4$  cel/mL, llegando a su fase exponencial en el día 7 con un valor de  $1.27 \cdot 10^6 \pm 8.84 \cdot 10^4$  cel/mL, y obteniendo un valor final de  $4.91 \cdot 10^6 \pm 9.94 \cdot 10^4$  cel/mL. Para la especie *Scenedesmus* sp. se obtuvo un valor inicial de  $1.09 \cdot 10^6 \pm 1.22 \cdot 10^5$  cel/mL, llegando a su fase exponencial en el día 4 con un valor de  $4.59 \cdot 10^6 \pm 1.10 \cdot 10^4$  cel/mL, dando un valor final de  $5.66 \cdot 10^6 \pm 6.63 \cdot 10^4$  cel/mL. Por último, el consorcio proporciona un valor inicial de  $5.95 \cdot 10^4 \pm 6.63 \cdot 10^2$  cel/mL, llegando a su fase exponencial en el día 4 con un valor de  $9.98 \cdot 10^4 \pm 5.52 \cdot 10^2$  cel/mL, además podemos observar un estado estacionario entre los días 2 y 11 con un valor promedio de  $1.09 \cdot 10^6 \pm 6.85 \cdot 10^3$  cel/mL, finalmente tenemos un valor de  $1.42 \cdot 10^6 \pm 1.2 \cdot 10^5$  cel/mL.

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA



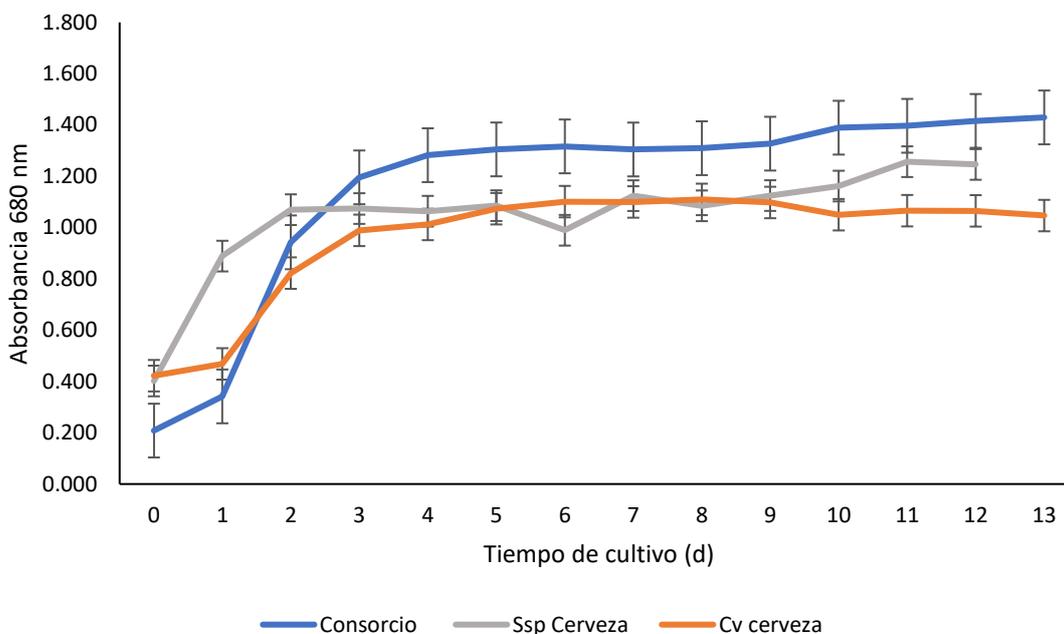
**Figura A.** Densidad celular (cel/mL) vs tiempo de cultivo (d) de *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus* sp. (Ssp) y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza artesanal por 13 y 12 días. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

- Densidad Óptica

Se graficaron las curvas de absorbancia a 680 nm de las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza artesanal por un periodo de 12 y 13 días, las mismas se muestran en la figura B. En la curva de absorbancia de *Chlorella vulgaris* puede observarse un valor inicial de densidad óptica de  $0.422 \pm 0.001$ , llegando a una fase exponencial en el día 1 con un valor de  $0.468 \pm 0.003$  aumentando hasta el día 5 con un valor de  $1.073 \pm 0.057$ , posteriormente se observa un estado estacionario entre el día 6 y 13 con un valor promedio de  $1.079 \pm 0.012$ . La curva de absorbancia de *Scenedesmus* Sp. muestra un valor inicial de  $0.402 \pm 0.011$  con una fase exponencial que comienza desde el primer día de cultivo, y dando un valor final de

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA

$1.246 \pm 0.005$ . La curva de absorbancia del consorcio arroja un valor inicial de  $0.208 \pm 0.006$ , con una fase exponencial que empieza en el día 1 con un valor de  $0.342 \pm 0.050$ , y un valor final de  $1.429 \pm 0.035$  al cabo de los 13 días de cultivo.



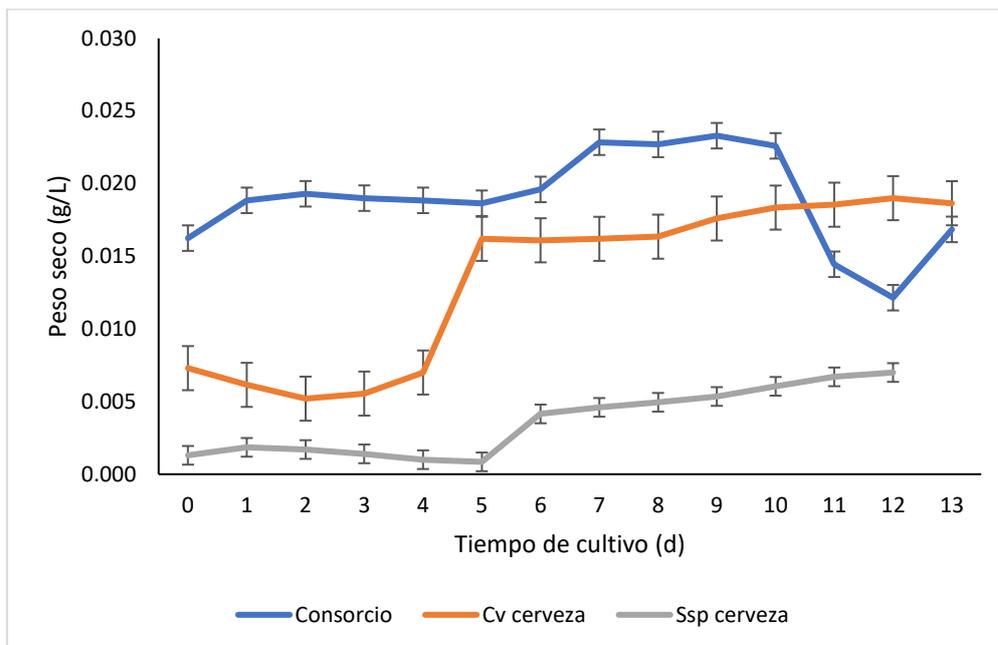
**Figura B.** Absorbancia a una longitud de onda de 680 nm vs tiempo de cultivo (d) de *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus sp.* (Ssp) y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza por 13 y 12 días. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

- **Peso Seco**

Se calculó el peso seco y se graficaron sus curvas para las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.* y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza artesanal durante un periodo de 12 días para la especie *Scenedesmus sp.*, y 13 días para la especie *C. vulgaris* y el consorcio de ambas especies, dichas curvas se muestran en la figura C. En la curva de *Chlorella vulgaris* podemos observar un valor inicial de  $0.0073 \pm 0.006$  g/mL, teniendo como fase exponencial el día 4 con un valor de  $0.007 \pm 0.003$  g/mL, y un valor final de  $0.0119 \pm 0.007$  g/mL. En la curva de *Scenedesmus sp.* se tiene un valor inicial de  $0.001 \pm 0.0001$  g/mL, con una fase exponencial en el día 5 arrojando un valor de  $0.001 \pm$

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA

0.0004 g/mL, y un valor final de  $0.007 \pm 0.0001$  g/mL. El consorcio arroja una curva con un valor inicial de  $0.016 \pm 0.002$ , una fase exponencial en el día 6 con un valor de  $0.020 \pm 0.013$  g/mL, y un valor final de  $0.017 \pm 0.011$  g/mL.



**Figura C.** Peso seco en (g/mL) vs tiempo de cultivo (d) de las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza por 13 y 12 días. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

Durante todo el cultivo se realizó la medición del pH como parámetro fisicoquímico, siendo el pH inicial de 5.15; sin embargo, a lo largo del periodo de cultivo este se fue estabilizando sin necesidad de soluciones para aumentar el nivel de pH; así desde el día uno se observó un aumento de pH con un valor de 6.1 hasta el día 6, posteriormente el pH se estableció en 7 hasta el final del cultivo. Para efectos de esta investigación no se muestra la curva de pH por no presentar cambios importantes. En la tabla 2 se refleja la biomasa total, productividad volumétrica, productividad específica, tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación de las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio obtenidas en 50 L de agua residual de cerveza como medio de cultivo.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**Tabla 2.** Generación de biomasa y productividad de *Chorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su Consorcio cultivadas en agua residual de cerveza artesanal.

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Consortio</b>	<b><i>C. vulgaris</i></b>	<b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>
Biomasa Total (g/L)	0,586	0,382	0,335
Productividad Volumétrica (g/L/d)	0,045	0,029	0,029
Productividad Específica (d <sup>-1</sup> )	0,077	0,077	0,088
Tasa de crecimiento específica (μ)	0,273	0,194	0,073
Tiempo de Duplicación (d)	2,538	3,577	9,524

- **Análisis de parámetros fisicoquímicos y remoción de nutrientes**

En la figura D se puede observar el porcentaje de remoción obtenido de los análisis realizados sobre nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT), en un periodo de cultivo de 12 y 13 días. En la figura D1 podemos observar el porcentaje de remoción del nitrógeno total (NT) para la especie *Chlorella vulgaris* con un valor inicial de  $131 \pm 4.95$  mg/L N, y un valor final de  $47 \pm 2.82$  mg/L N, presentando un porcentaje total de remoción del 64.12% al final del cultivo. Respecto a *Scenedesmus* sp. puede observarse un valor inicial de  $35 \pm 1.414$  mg/L N, y un valor final de  $4 \pm 1.414$  mg/L N, obteniendo un porcentaje de remoción total del 88.57%. Para el consorcio se tiene un valor inicial de  $40.5 \pm 0.707$  mg/L N, y un valor final de  $4 \pm 1.414$  mg/L N, logrando un porcentaje total de remoción del 90.12%, siendo este mejor que los porcentajes de remoción de las especies cultivadas individualmente.

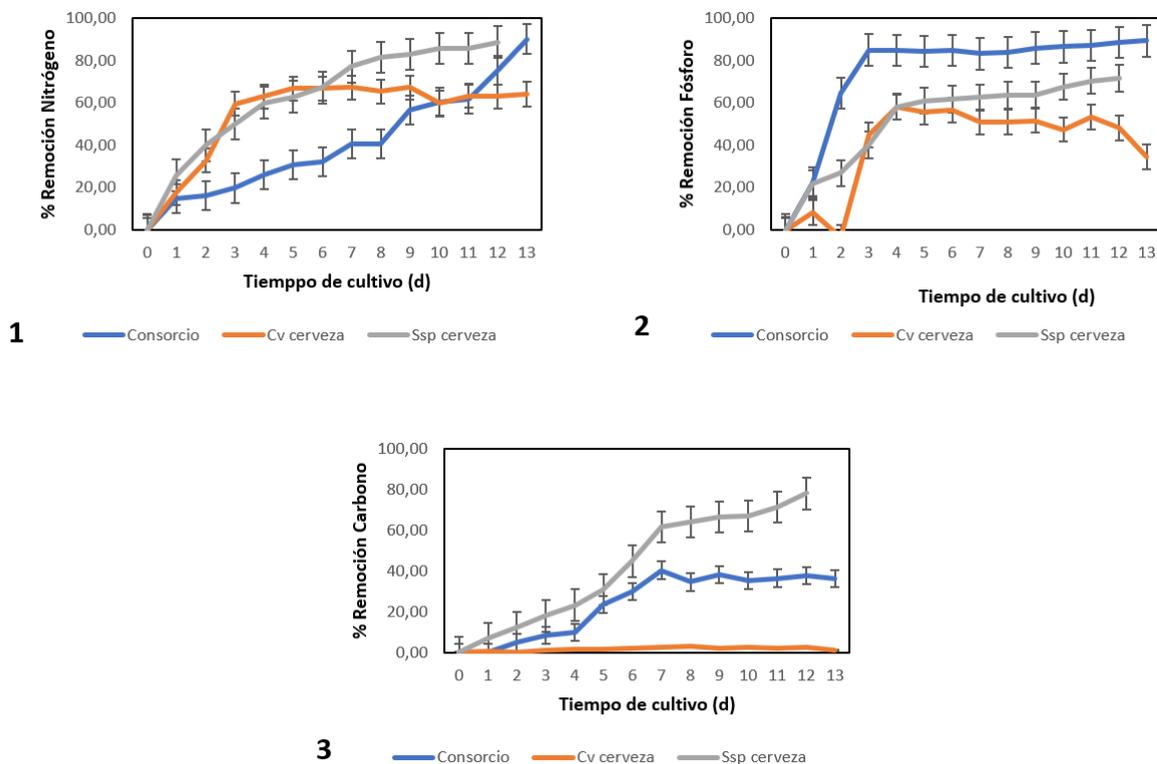
En la figura D2 se observa el porcentaje de remoción del fósforo total (PT), respecto a *Chlorella vulgaris*, observando un valor inicial de  $511.40 \pm 11.172$  mg/L PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, y un valor final de  $334.35 \pm 36.699$  mg/L PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, obteniendo un porcentaje total de remoción

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

del 34.62%. La especie *Scenedesmus* sp. presentó un valor inicial de  $152.2 \pm 4.101$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , y un valor final de  $43.7 \pm 0.707$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , obteniendo un porcentaje total de remoción del 71.66%. En cuanto al consorcio, pudo observarse un valor inicial de  $314.5 \pm 1.768$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , y un valor final de  $33.85 \pm 0.212$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , logrando un porcentaje total de remoción del 89.24%, teniendo un porcentaje mayor respecto a las especies cultivadas individualmente.

En la figura D3 podemos observar el porcentaje de remoción del carbono orgánico total (COT); respecto a *Chlorella vulgaris* se tiene un valor inicial de  $896.50 \pm 0.707$  mg/L C, y un valor final de  $886 \pm 4.243$  mg/L C, obteniendo un porcentaje total de remoción del 1.17%. Para *Scenedesmus* sp. se obtuvo un valor inicial de  $864.5 \pm 0.707$  mg/L C, y un valor final de  $189.5 \pm 2.121$  mg/L C, con un porcentaje de remoción total del 78.08%. En cuanto al consorcio se observó un valor inicial de  $835 \pm 0.71$  mg/L C, y un valor final de  $532.5 \pm 6.36$  mg/L C, logrando un porcentaje total de remoción del 36.23%. Teniendo en cuenta esto podemos señalar que la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de cerveza tiene un mejor porcentaje de remoción en cuanto al carbono.

# OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA



**Figura D.** Porcentaje de remoción de nutrientes en *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus* sp. (Spp) y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza artesanal. A % remoción de nitrógeno total. B % remoción de fósforo total. C % remoción de carbono total. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

En la tabla 3 se observa el porcentaje de remoción de nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y carbono orgánico total (COT) del consorcio cultivado en agua residual de cerveza artesanal, en la misma se especifica la concentración inicial, concentración final y su remoción. En la tabla 4 se observa el porcentaje de remoción de cada nutriente y metal pesado que se encontró en el agua residual de cerveza artesanal con sus respectivas concentraciones al inicio del cultivo y en el sobrenadante final luego del periodo de cultivo de 13 días para el consorcio de microalgas de estudio.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**Tabla 3.** Remoción total de Nitrógeno, Fósforo y Carbono total por las especies en consorcio cultivadas en agua residual de cerveza artesanal.

<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Remoción Total (%)</b>
<b>Nitrógeno Total (mg/L N)</b>	40.5 ± 0.707	4 ± 1.414	90.12
<b>Fósforo Total (mg/L PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>)</b>	314.5 ± 1.768	33.85 ± 0.212	89.24
<b>Carbono Orgánico Total (mg/L C)</b>	835 ± 0.71	532.5 ± 6.36	36.23

**Tabla 4.** Remoción de nutrientes en agua residual de cerveza artesanal por el Consorcio de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. LD: Limite de Detección. \* Valores fuera de rango. - Sin remoción.

<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Remoción Total (%)</b>
<b>Calcio (mg/l)</b>	11.76 ± 0.05	13.44 ± 0.06	-
<b>Cobre (mg/l)</b>	0.040 ± 0.002	0.060 ± 0.003	-
<b>Cromo (mg/l)</b>	< 0.01 LD	< 0.01 LD	*
<b>Hierro (mg/l)</b>	0.020 ± 0.001	0.31 ± 0.02	-
<b>Molibdeno (mg/l)</b>	< 0.04	0.060 ± 0.004	-
<b>Nitrógeno amoniacal (mg/l)</b>	10.24 ± 0.61	6.92 ± 0.41	32,42
<b>Níquel (mg/l)</b>	< 0.05	<0.05	*
<b>Plomo (mg/l)</b>	< 0.05 LD	<0.05 LD	*
<b>Potasio (mg/l)</b>	71.10 ± 4.41	73.94 ± 4.58	-
<b>Sodio (mg/l)</b>	3.72 ± 0.30	35.59 ± 2.88	-
<b>Turbidez (NTU)</b>	8.60	85.40	-

Se observó un incremento de concentración en la mayoría de los parámetros; sin embargo, el nitrógeno amoniacal tuvo un porcentaje de remoción del 32.42%. Del cromo,

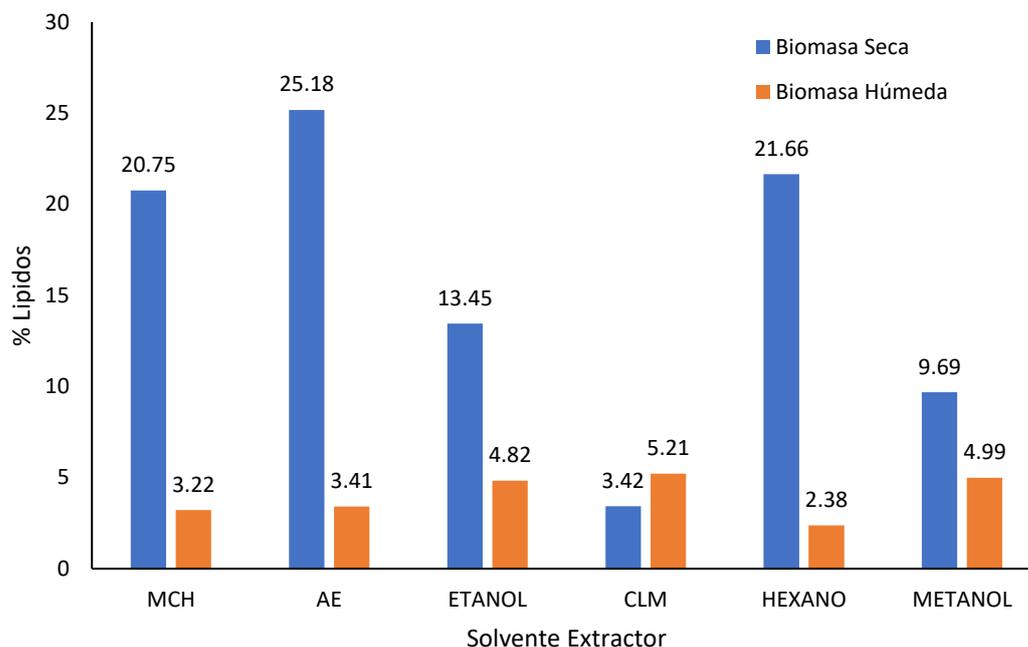
## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

níquel y plomo no fue posible obtener un porcentaje de remoción debido que las concentraciones estuvieron fuera de rango de la técnica estándar de medición.

- **Extracción de lípidos**
  - Extracción de Lípidos Totales

En la figura E puede observarse los porcentajes de lípidos extraídos a partir de biomasa seca y húmeda del consorcio expuestos a seis solventes extractores de carácter orgánico. Se obtuvo una productividad total de 0.0092 g/L/d y una productividad específica de 0.077 d<sup>-1</sup>, teniendo como mejor solvente extractor para biomasa seca al acetato de etilo con un 25.18% de lípidos extraídos, con una productividad de 0.232 g/L/d. El segundo mejor solvente fue el hexano, teniendo un 21.66% de lípidos extraídos, con una productividad de 0.199 g/L/d. El tercer mejor solvente fue el metilciclohexano con un 20.75% de lípidos extraídos y una productividad de 0.191 g/L/d. Para la biomasa húmeda podemos observar que se obtienen valores muy bajos en comparación a lo extraído con la biomasa seca, siendo el mejor solvente el cloroformo: metanol (1:2) con un valor de 5.21% de lípidos extraídos y una productividad de 0.048 g/L/d.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

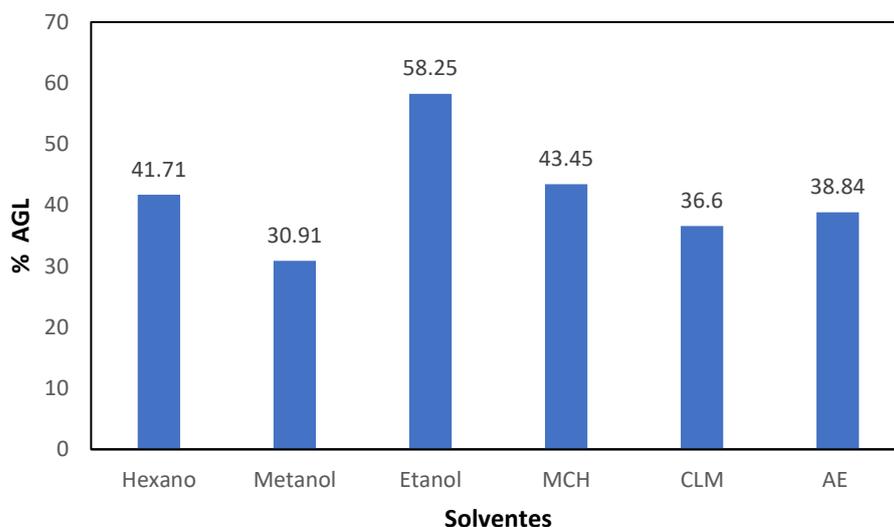


**Figura E.** Lípidos extraídos de biomasa seca y húmeda de las especies en Consorcio (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.) cultivadas en agua residual de cerveza artesanal. Con solventes extractores como Metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), cloroformo: metanol (1:2) (CM), etanol, hexano y metanol. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

○ Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

En la figura F puede observarse los porcentajes de AGL extraídos a partir de biomasa seca del consorcio, teniendo como mejor solvente extractor al etanol con un porcentaje de AGL del 58.25%. El segundo mejor solvente fue el metilciclohexano con un porcentaje de AGL del 43.45%, y como tercer mejor extractor tenemos al hexano con un porcentaje de 41.71%. Esta determinación se realizó únicamente con la biomasa seca, considerando los bajos porcentajes de lípidos extraídos a partir de la biomasa húmeda.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**



**Figura F.** Extracción de Ácidos Grasos Libres con biomasa seca de las especies en consorcio (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.) cultivadas en agua residual de cerveza artesanal. Con solventes extractores como Metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), cloroformo: metanol (1:2) (CM), etanol, hexano y metanol. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

- Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

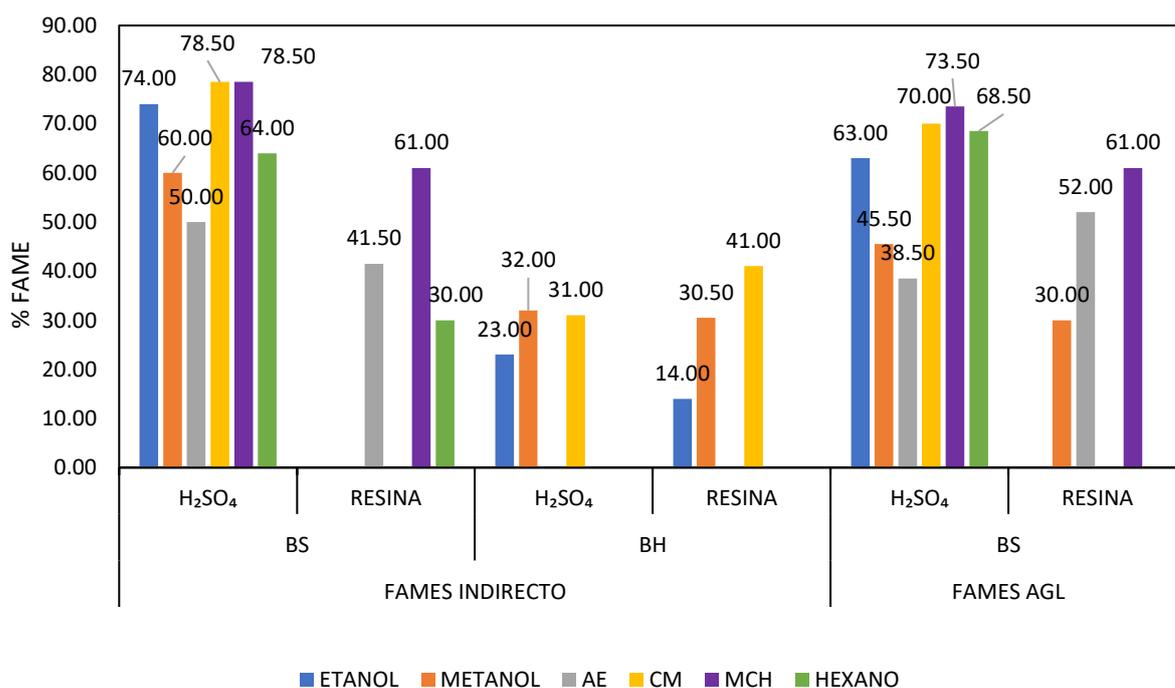
En la figura G podemos observar la extracción de FAME indirecto con biomasa seca y húmeda, usando un catalizador de ácido sulfúrico y uno de resina comercial (CT-269DR). En cuanto a la extracción de FAME indirecto con biomasa seca podemos observar que se obtuvo un porcentaje más alto con el catalizador ácido en comparación con la resina comercial. De metilciclohexano y cloroformo: metanol (1:2) se logró extraer un 78.5%, siendo los mejores solventes para la extracción con catalizador ácido. El tercer mejor solvente fue el etanol con un porcentaje de 74.0%.

Para la extracción de FAME indirecto con biomasa húmeda (BH) se observa que con el catalizador ácido se logra obtener como mejor solvente al metanol con un porcentaje de 32.0%, seguido de cloroformo: metanol (1:2) con un porcentaje de 31.0%. Con la

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA

resina comercial el mejor solvente fue el cloroformo: metanol (1:2) con un porcentaje del 41.0%.

En la extracción de FAME de AGL se usó biomasa seca (BS), en donde puede observarse que los tres mejores solventes se lograron con el catalizador ácido, teniendo así en primer lugar al metilciclohexano con un porcentaje de 73.5%, el segundo mejor extractor fue el cloroformo: metanol (1:2) con un porcentaje del 70.0%, y el tercer mejor extractor fue el hexano con un porcentaje del 68.5%. En cuanto a la resina comercial, tenemos como mejor solvente extractor al metilciclohexano con un porcentaje del 61.0%.



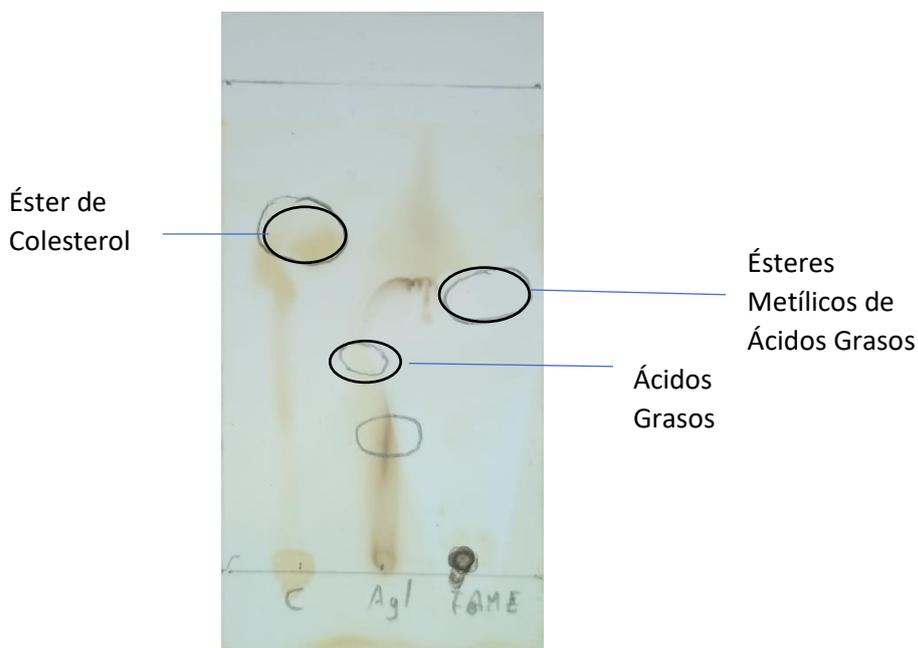
**Figura G.** Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) del consorcio de las especies (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp.) cultivadas en agua residual de cerveza artesanal. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

- **Cromatografía de capa fina (Thin layer chromatography-TLC)**

En la figura H se puede observar la corrida de las muestras de AGL y FAME obtenidos con hexano como solvente y su control correspondiente a un éster de colesterol,

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

la fase móvil se realizó con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con lo cual se observaron las diferentes distancias que recorrieron las muestras utilizadas, como se especifica en la tabla 5.



**Figura H.** Cromatografía en capa fina de AGL y FAME obtenidos a partir del consorcio cultivado en agua residual de cerveza artesanal.

**Tabla 5.** Factor de Retención de AGL y FAME obtenido con el consorcio en agua residual de cerveza artesanal ( $R_f$ : factor de retención. X: distancia total. Y: distancia recorrida por la muestra).

<b>Muestra</b>	<b>X(cm)</b>	<b>Y(cm)</b>	<b>Rf</b>
Estándar	6	4,3	0,717
AGL	6	2,8	0,467
FAME	6	3,5	0,583

# OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Caracterización del agua residual

En la tabla 1 cual podemos observar que los valores de nitrógeno y fosforo total se acercan a los del medio BBM, por otro lado, en el carbono orgánico total tenemos un valor mucho mayor presente en el agua residual, indicando que el medio puede ser apto para el crecimiento microalgal según una investigación de Sharma (2020) ya que indica que estos parámetros son esenciales para el crecimiento microalgal optimo.

### Crecimiento celular

La figura A muestra la densidad celular de las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmu* sp. y el consorcio de estas cultivadas en agua residual de cerveza, y en ella puede observarse que el consorcio en comparación a las especies cultivadas individualmente no tuvo un mayor crecimiento. Esto puede deberse a que al ser dos especies en un medio se mantienen en una relación competitiva por los nutrientes presentes (Tang et al., 2023). El agua residual de cerveza contiene alta demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno, fósforo y otras cargas orgánicas elevadas que lo hacen adecuado para que se pueda dar el crecimiento de microalgas (Amenorfenyo et al., 2019). Las microalgas tienen la capacidad de fijar CO<sub>2</sub> mediante la fotosíntesis; sin embargo, con grandes concentraciones tiende a ser tóxico, a pesar de esto existe cepas como las usadas en este estudio que pueden tolerar altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Song et al., 2020) permitiendo así poder crecer de mejor manera en este medio. Las aguas residuales de la industria cervecera contienen niveles de contaminantes como bacterias, levaduras,

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

protozoos y hongos que inhiben el crecimiento de microalgas, debido a que compiten con las microalgas por nutrientes y otros minerales (Amenorfenyo et al., 2019).

Según la investigación de Ramsundar et al., (2017) se ha observado que el autoclave es el mejor tratamiento para la eliminación microbiana de modo que el agua pueda tener menos competencia con otros microorganismos, razón por la cual, el agua de cultivo fue esterilizada previamente. Al agua residual de cerveza presentó un color marrón característico de cerveza artesanal y turbidez, por ello se le realizó una dilución 1:10, ya que como menciona Larsdotter, (2006), las microalgas son organismos fotótrofos; es decir, obtienen energía de la luz, por lo que la presencia de color y turbidez en el medio pudo afectarles en su crecimiento.

En la figura B se aprecia un aumento considerable de la absorbancia desde el primer día de cultivo hasta el día final, en comparación con las especies cultivadas individualmente, llegando a tener su valor más alto en el día 13, esto debido a la mayor turbidez que presentó en comparación con las especies cultivadas de manera individual, tal como se muestra en la tabla 4 en la que se registra un valor inicial de turbidez de 8.60 NTU y un valor final de 85.40 NTU. Según estudios de Ferreira et al., (2017) una menor tasa de dilución permite una mayor remoción de nutrientes; sin embargo, esto significa tener mayor turbidez en el medio, lo que justifica el mayor valor de densidad óptica.

En la figura C podemos observar los valores de peso seco de las especies cultivadas individualmente y su consorcio, respectivamente. El consorcio presenta un mayor valor de peso seco a lo largo del periodo de cultivo, siendo su valor más alto en el día 9, esto se justifica en la Tabla 2 ya que el consorcio logra tener un valor más alto de biomasa total en comparación con las especies individuales. En una investigación de Choi

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

(2016) *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., presentan valores de biomasa total incluso mayores a las del consorcio de este estudio, esto debido a que se utilizaron diferentes técnicas en cuanto a su cultivo, ya que se realizaron días con luz y sin luz, siendo los días sin luz más efectivos para la producción de biomasa. Cabe recalcar que en ambas situaciones se mantuvo la aireación, además de tener un periodo de cultivo más largo. Estos resultados se justifican con informes de Simate (2015) ya que menciona que el crecimiento heterótrofo aumenta significativamente la concentración de células de microalgas.

En la Tabla 2 se observa que la productividad volumétrica del consorcio es mayor a la de las especies; en cuanto a la productividad específica, la mejor fue para *Scenedesmus* sp. No se puede realizar una comparación exacta con otros autores debido a que en cada investigación se utilizaron diferentes condiciones de cultivo; sin embargo, los valores obtenidos en este estudio se asemejan a los obtenidos por Nayak et al., (2011) y Yirgu (2020) en la cual se obtuvo un valor de  $0.085 \text{ d}^{-1}$  para *Chlorella vulgaris* y  $0.99 \text{ d}^{-1}$  para *Scenedesmus* sp.

### **Remoción de nutrientes**

En la figura D1 se presentan los porcentajes de remoción de nitrógeno total (NT) a lo largo del periodo de cultivo, teniendo que *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. tienen un porcentaje de remoción más alto en los primeros días llegando a un total de remoción de 64.12% para *C. vulgaris* y 88.57% para *Scenedesmus* sp.; sin embargo, el consorcio mantuvo una fase exponencial en cuanto a la remoción de nitrógeno total, llegando a un total de remoción más alto en el día final de cultivo con un porcentaje de 90.12%.

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

Es importante mencionar que el nivel de pH del medio interviene directamente en los procesos metabólicos de las microalgas, incluyendo el consumo de nutrientes, debido a que no pueden tolerar concentraciones de pH muy alto ni muy bajo según una investigación Sharma et al., (2018). Considerando que durante el tiempo de cultivo el pH se mantuvo entre 6 y 7, se presume que sea por esta razón que la remoción de nitrógeno se dio de manera progresiva hasta alcanzar su valor máximo.

En la figura D2 observamos la remoción de fósforo en la cual tenemos que el consorcio logra un valor mayor desde el día 1 logrando un 89.24% en el día final de cultivo, comparado con las especies cultivadas individualmente que lograron un porcentaje de 34.62% para *Chlorella vulgaris* y un 71.66% para *Scenedesmus* sp. En la investigación de Procházková et al. (2013) se menciona que el fósforo se une fácilmente con varios iones de  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{Fe}^{3-}$  lo que resulta en limitaciones en cuanto al crecimiento de las microalgas, haciendo que se precipiten los nutrientes y no estén disponibles para las microalgas. Para esto las microalgas en condiciones de abundancia de fósforo tienen una fase denominada captación de lujo en la que forman grandes gránulos de polifosfato y las almacenan para poder metabolizarlas en condiciones de ausencia de fósforo. Según una investigación de Cade-Menun y Paytan (2010) el estrés lumínico influye en la absorción del fósforo presente en el medio, y debido a que el agua residual de cerveza tenía un alto grado de turbidez, se puede justificar que el consorcio fue capaz de remover este nutriente de manera eficaz.

En la figura D3 se puede observar el porcentaje de remoción del carbono orgánico total (COT), en este caso tenemos que *Scenedesmus* sp. logra un porcentaje más alto de remoción con un porcentaje final de 78.08%, a diferencia del consorcio que logró un porcentaje bajo de 36.23%. En una investigación de Oscanoa Huaynate et al., (2015) se

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

menciona que diferentes especies de microalgas pueden crecer de manera óptima hasta con un 100% de dióxido de carbono adicional en el medio; sin embargo, estos estudios con mayores tiempos de cultivo respecto de la actual investigación. El porcentaje de remoción debió verse afectado debido que además de tener una alta carga de carbono en el medio residual original, también se mantuvo un suministro de aire continuo durante todo el periodo de cultivo.

En la Tabla 4 observamos la remoción de nutrientes y otros metales pesados presentes en el agua residual de cerveza antes de iniciar y al finalizar el periodo de cultivo. El calcio presenta un aumento de concentración en el medio por lo que no existió una remoción; el cobre de igual manera no tiene un porcentaje de remoción debido al aumento de concentración; el hierro presenta un crecimiento significativo en su concentración final. El molibdeno también aumentó su concentración final y para el nitrógeno amoniacal se logró un porcentaje de remoción total de 32.42%.

Estos nutrientes son iones o metales que aparecen en los medios, aunque no se consuman son muy importantes para preservar la presión osmótica y el equilibrio iónico. En investigaciones de Fidalgo (1995) se menciona sobre la importancia de estos nutrientes en las microalgas, el sodio es un activador de varias enzimas. El calcio es parte de la pared celular, regula el flujo electrónico (Zhu et al., 2016). El nitrógeno amoniacal contribuye en el crecimiento de estas especies, y por ende en la remoción de este nutriente. En estudios de Choi y Lee (2013) se menciona que *Chlorella vulgaris* logra un porcentaje de remoción de nitrógeno amoniacal del 100% en concentraciones iniciales entre 15.22 mg/L. Según Araujol, I., & Morales, E. (2004) *Scenedesmus* sp. también obtuvo un 100% de remoción de este nutriente; sin embargo, en este estudio el consorcio obtuvo un porcentaje de remoción de 32.42% con una concentración inicial de 10.24 mg/L, esto

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

puede deberse al tiempo de cultivo ya que en los estudios comparados se realiza un periodo más extenso permitiendo que se dé una mejor remoción.

### **Extracción de lípidos**

Para que una biomasa de microalgas sea atractiva para la producción de biocombustibles debe tener altas productividades de lípidos y tener porcentajes mayores al 30% debido a los costosos procesos de extracción (Serrano, 2012).

En la figura E podemos observar los lípidos extraídos con biomasa seca y húmeda del consorcio con seis solventes distintos, los lípidos obtenidos con biomasa húmeda no presentaron porcentajes de lípidos de interés, siendo el mejor solvente cloroformo:metanol (1:2), mientras que para la biomasa seca el mejor solvente fue el acetato de etilo seguido de hexano. En comparación con investigaciones de Guasumba (2022) que realiza cultivos de las especies por separado, podemos observar que su mejor solvente para biomasa seca de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. fue la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje de 17.59% y 19.07%, respectivamente. En investigaciones de Dos Santos et al. (2015) quienes realizaron una comparación entre varios métodos de extracción de lípidos totales, probaron cuatro métodos de extracción, con etanol, hexano, cloroformo:metanol (1:2) y cloroformo:metanol (2:1). Entre los cuatro solventes utilizados el que logró un mejor porcentaje fue el cloroformo:metanol (1:2) con un valor de 24.5%; menciona además que los disolventes no polares como el cloroformo, son mejores para la extracción de lípidos neutros, debido a que interactúa con las fuerzas de Van der Waals para formar un complejo orgánico, impulsado por un gradiente de concentración que se difunde a través de la membrana celular y de la película estática de disolvente orgánico que rodea la célula. Sin embargo, posteriormente se

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

necesita un disolvente polar como el metanol para eliminar los lípidos de la membrana celular. Es por eso por lo que se ha combinado estos dos disolventes para efectos de hacer este procedimiento de manera más eficaz.

En este estudio la mezcla cloroformo:metanol (1:2) no fue tan eficaz como en las investigaciones mencionadas, en este caso el mejor solvente fue el acetato de etilo, el cual al igual que el cloroformo es apolar lo que lo hace ideal para la extracción de lípidos, posteriormente se usó un disolvente polar como el metanol para poder tener una extracción eficaz de lípidos. En cuanto al hexano que fue el segundo mejor disolvente del consorcio, en investigaciones de Pérez et al. (2018) se evidencia que con una mezcla de metanol:hexano (1:3) se obtiene un porcentaje de 20.37% presentando una mínima diferencia con el hexano utilizado en el consorcio.

### **Extracción de AGL**

En la figura F podemos observar la extracción de ácidos grasos libres con biomasa seca, utilizando seis solventes orgánicos distintos. En comparación con investigaciones de Guasumba (2022) obtiene como mejores solventes al metanol y etanol con porcentajes del 38.52% y 37.81%, respectivamente. En este estudio se obtuvo como mejor solvente al etanol, seguido del metilciclohexano; en ambos casos el porcentaje es mayor que los mejores solventes obtenidos de las especies de forma individual. En investigaciones de Bermúdez et al. (2018) con *Scenedesmus* sp. se utilizó cloroformo puro para hacer la extracción logrando un porcentaje de 59.89%, con el acetato de etilo se logró un porcentaje de 59.41%, siendo mayor que los porcentajes de este estudio en el que se logró con cloroformo:metanol un porcentaje de 36.6% y con acetato de etilo un porcentaje de 38.84%. Esto puede deberse al tiempo de cultivo ya que en la investigación mencionada

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

se realiza el cultivo en diferentes condiciones y diferentes técnicas como periodos de cultivo sin luz para mejorar la eficacia de la producción de AGL.

En investigaciones hechas por Shen et al., (2015) con *Chlorella vulgaris* se obtiene un porcentaje de AGL del 30% con metanol y etanol; sin embargo, con el aumento de glucosa en el medio se logra obtener un 89.1% m/m de extracción, lo cual en comparación con el consorcio cultivado en condiciones normales es significativamente más alto.

El mejor solvente en este estudio fue el etanol, logrando un porcentaje mayor con un valor del 58.25%, en dicha investigación se obtiene un 21.4% con el mismo solvente. Es importante mencionar que en la investigación se realizan varios tratamientos añadiendo HCl 3 M lo que mejoraría la eficacia en ciertos solventes.

### **Extracción de FAMEs**

En la figura G podemos observar los porcentajes de extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) del consorcio, con un catalizador ácido homogéneo como el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y un catalizador ácido heterogéneo como la resina comercial CT-269. Se utilizaron seis solventes para biomasa seca con catalizador ácido tanto en FAME indirectos como FAME de AGL, para la resina solo se utilizaron los 3 mejores solventes.

En FAME indirectos usando biomasa seca con el catalizador ácido homogéneo se obtuvo que los mejores solventes fueron la mezcla cloroformo:metanol (1:2) y el metilciclohexano con un porcentaje del 78.5% para ambos solvente. El tercer mejor solvente fue el etanol con un porcentaje del 74.0%, seguidos del hexano, metanol y acetato de etilo con porcentajes del 64.0%, 60.0% y 50%, respectivamente. Para la biomasa húmeda en FAME indirectos solo se realizó extracciones con tres solventes, de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

los cuales se obtuvo que el mejor solvente fue el metanol con un porcentaje de 32.0%, seguido del cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje del 31.0%, y finalmente tenemos al etanol con un 23.0%. En cuanto a la extracción con resina, para la biomasa seca podemos observar que el mejor solvente fue el metilciclohexano con un porcentaje del 61.0%, Le sigue el acetato de etilo con un porcentaje del 41.50%, finalmente tenemos al hexano con un 30.0%. Para la biomasa húmeda tenemos que el mejor solvente fue el cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje del 41.0%, seguido del metanol con un porcentaje del 30.5%, y finalmente el etanol con un 14.0%. Para los FAMES de AGL se usaron seis solventes, en los que se utilizó el catalizador ácido, podemos observar que el mejor solvente fue el metilciclohexano con un porcentaje del 73.50%, como segundo mejor solvente tenemos al cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje del 70.0%, el tercer mejor solvente fue el hexano con un porcentaje del 68.5%, luego tenemos al etanol con un porcentaje del 63.0%, seguido del metanol con un porcentaje del 45.5%, y finalmente el acetato de etilo con un porcentaje del 38.5%. La extracción realizada con resina nos arroja al metilciclohexano como mejor solvente con un porcentaje del 61.0%, seguido del acetato de etilo con un 52.0%, y finalmente al metanol con 30.0%. En investigaciones de Mathimani et al., (2015) para *Chlorella vulgaris* se obtuvo un rendimiento máximo del 65% con catálisis alcalina mediada por NaOH, y un rendimiento de 45.26% con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se menciona que el mayor rendimiento pudo deberse a que el catalizador ácido se utilizó tanto para la esterificación de AGL como para la transesterificación del aceite en éster y no desencadena una reacción de saponificación en presencia de FAME. En cuanto a *Scenedesmus* sp. según investigaciones de Shin et al., (2014) se logra extraer un máximo de 68.57% con hexano y 65.08% con

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

cloroformo:metanol (1:2) en un medio compuesto por urea, lo cual en comparación a este estudio con agua residual de cerveza se logra obtener valores similares.

Se puede observar que la extracción con el catalizador ácido para biomasa seca es significativamente mayor en comparación a los extraídos con resina y FAME indirectos con biomasa húmeda. Según investigaciones de Tang et al. (2023) los FAME extraídos de cultivos en consorcio presentan mejoras en las propiedades del combustible, como el número de cetano, el valor calorífico, número de octanos, número de yodo, densidad, viscosidad cinemática, etc. Además, se puede observar la composición de los FAME extraídos, de lo cual se menciona que los co-cultivos también presentan una desventaja sobre el contenido de UFA (ácidos grasos insaturados) ya que afectan al punto de obstrucción del filtro de frío o por sus siglas en inglés (CFPP) del biodiesel, señala que cuanto menor sea el valor de CFPP mejor será la fluidez a baja temperatura del biodiesel.

En el presente estudio no se hizo un análisis en cuanto a la composición de FAME; sin embargo, en base a los porcentajes obtenidos se puede mencionar que se da un mejor porcentaje de extracción en forma de consorcio que en los cultivos individuales.

### **Cromatografía**

En la Tabla 5 podemos observar el factor de retención obtenido a partir de la extracción hecha con los mejores solventes de AGL y FAME. El estándar obtuvo un  $R_f$  de 0.717, según investigaciones de Rodríguez (2008) el éster de colesterol se recorre más rápido en la placa de sílica gel ya que es un lípido apolar, por lo que logra un valor de  $R_f$  mayor a las otras muestras. Para AGL se obtuvo un valor de  $R_f$  de 0.46, en investigaciones de Ferrari (2005) se logra obtener un  $R_f$  de 0.44, lo que nos indica que si existe la presencia de ácidos grasos libres (AGL). Por último, para FAME se obtuvo un valor de  $R_f$  de 0.65,

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

Ferrari (2005) en su investigación logro un valor de  $R_f$  de 0.70, el cual se acerca al valor obtenido en este estudio, pudiendo justificar la existencia de FAME.

## **6. CONCLUSIONES**

En este estudio se logró comprobar que el consorcio de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. pueden adaptarse y crecer de manera eficaz en agua residual de cerveza para obtener biomasa, siendo más eficaz en la obtención de biomasa total en comparación con las especies cultivadas de manera individual.

El consorcio alcanzó un porcentaje de remoción de nutrientes alto en el periodo de tiempo de cultivo que se realizó en comparación con las especies por separado, por lo que se ha demostrado que el consorcio tiene un mejor potencial para el tratamiento de aguas residuales.

En cuanto a la extracción de lípidos se identificaron varios solventes como acetato de etilo, hexano y metilciclohexano, con los que se puede realizar un mejor desempeño, al combinar las dos especies en un co-cultivo se ve mejorada la productividad. Los ácidos grasos libres (AGL) y FAMES presentaron valores cercanos a los de diferentes autores por lo que se concluye que realizar un cultivo en consorcio de ambas especies contribuye significativamente en todos los análisis que se realizaron en esta investigación.

## **7. RECOMENDACIONES**

Se recomienda alargar el tiempo de cultivo para realizar una mayor remoción de nutrientes y un mejor desempeño en la obtención de biomasa. Según Choi, (2016b) se recomienda realizar diferentes tratamientos en el cultivo realizado, como disponer de periodos con luz y sin luz, pero manteniendo una fuente de aireación constante, ya que esto contribuiría en la producción total de biomasa. También se recomienda realizar dos

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA**

etapas de cultivo, en la primera etapa realizar un cultivo fotoautotrófico y en la segunda etapa un cultivo fotoheterotrófico para mejorar la productividad.

## **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 DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**REFERENCIAS**

- Abedini Najafabadi, H., Pazuki, G., & Vossoughi, M. (2015). Experimental study and thermodynamic modeling for purification of extracted algal lipids using an organic/aqueous two-phase system. *RSC Advances*, 5(2), 1153–1160. <https://doi.org/10.1039/c4ra11914b>
- Alarcón, S. D. M., Salas, W. A. G., & Velandia, G. A. S. (2021). Estudio comparativo entre energía eléctrica y energía solar en viviendas unifamiliares. *Formación Estratégica*, 3(01), 98-15.
- 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), 1910. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111910>
- Araujol, I., & Morales, E. (2004). En la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(2), 94-108.
- Barboza, M. J. (2022, 9 febrero). *Repositorio de la Universidad Internacional SEK Ecuador: Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual de cerveza artesanal*. <https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4538>
- BERMUDEZ-SIERRA, JOSÉ JOVANNY. (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>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

- Cabrera, N. A. (2016). Production and analysis of Biodiesel from the fruits of *Roystonea oleracea*. 18.
- Cade-Menun, B. J., & Paytan, A. (2010). Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon forms in culture-grown algae. *Marine Chemistry*, 121(1-4), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2010.03.002>
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., & Gama Melão, M. D. G. (2013). Calorific values of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different phosphorus concentrations. *Phycological Research*, 61(4), 286–291. <https://doi.org/10.1111/pre.12026>
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Claxton, R., & Das, K. C. (2010). Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. *Bioresource technology*, 101(17), 6751-6760.
- 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, H. J., & Lee, S. M. (2013). Performance of *Chlorella vulgaris* for the Removal of Ammonia-Nitrogen from Wastewater. *Environmental Engineering Research*, 18(4), 235-239. <https://doi.org/10.4491/eer.2013.18.4.235>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

- Corso, H. L. (2022). BIOENERGÍA Y BIORREMEDIACIÓN: ENERGÍA Y AMBIENTE (Dossier completo). Desde la patagonia. Difundiendo saberes, 19(33), 36-36.
- Sharma, J., Kumar, S. S., Bishnoi, N. R., & Pugazhendhi, A. (2018). Enhancement of lipid production from algal biomass through various growth parameters. *Journal of Molecular Liquids*, 269, 712-720. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.103>
- Cruel Preciado, M., y Vernaza Arroyo, G. D. (2022). Uso de biocombustibles en Ecuador: Una mirada desde la protección de los derechos de la naturaleza. *Revista Venezolana de Gerencia*, 27(Especial 7), 477-491. <https://doi.org/10.52080/rvgluz.27.7.31>
- Dejoye 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 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>
- Eladel, H., Abomohra, A. E. F., Battah, M., Mohammed, S., Radwan, A., & Abdelrahim, H. (2019). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(3), 425–433. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2046-5>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

- Espinoza, G. T. (2021). Retrospectiva y Prospectiva del Desarrollo de las Generaciones de Biocombustibles. *Ciencia y tecnología*, (21), 4.
- Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., & Badillo-Corona, J. A. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 101-115.
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P. A., Ferreira, A. F., Dias, A. P., Pinheiro, H. M., Reis, A., & Gouveia, L. (2017). *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO<sub>2</sub> biofixation for green energy purposes. *Journal of Cleaner Production*, 165, 1316-1327.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.232>
- Fidalgo, P. (1995). Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. *Growth (Lakeland)*, 1–20.
- Fogelbach, G. G., Ramon, G. D., Staffeld, P. L., Sarabia, A. M. C., López, C. A. S. R., Duarte, P. A., ... & de Cordova Aguirre, J. C. F. (2020). Contaminación atmosférica en América Latina: impacto en la salud Y regulación actual-reporte del grupo del Comité de Aerobiología de la Sociedad Latinoamericana de Asma, Alergia e Inmunología. *Archivos de Asma, Alergia e Inmunologia*, 4(4), 423-34.
- Fula, J. G., & Vilorio, A. (2015). Estudio Sobre el Abastecimiento Constante de Energía Eólica. *Investigación e Innovación en Ingenierías*, 3(2).
- Gellibert Noblecilla, M. V., Ramirez Pozo, K. P., & Aray, M. (2017). Diseño de un tratamiento para agua residuales en una planta cervecera mediante microalga *Chlorella vulgaris* (Doctoral dissertation, ESPOL. FCV.).

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

González, J. R. Q., & González, L. E. Q. (2015). Energía mareomotriz: potencial energético y medio ambiente. *Gestión y ambiente*, 18(2), 121-134.

Guasumba Anchundia, L. F. (2022). Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual de cerveza artesanal.

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>

Jacome-Pilco, C., Ballesteros, C., Rea, E., & Cayambe, L. M. R. (2021). Microalgas en el tratamiento de aguas residuales generadas en industrias de curtiembres. *Ciencia y Tecnología*, 14(2), 47-55.

Loera-Quezada, M., & Olguin, E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*, 1(1), 91-116.

Machado, C. (2010). Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe. Brasilia (Brasil): Organización latinoamericana de energía-IICA.

MAE. (2015). Revision Del Anexo 1 Del Libro Vi Del Texto Unificado De Legislacion Secundaria Del Ministerio Del Ambiente: Norma De Calidad Ambiental Y De Descarga De Efluentes Al Recurso Agua. Registro Oficial No. 387, 97, 1–40.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

- 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>
- Nayak, M., Jena, J., Bhakta, S., Rath, S. S., Sarika, C., Rao, B. V. S. K., Pradhan, N., Thirunavoukkarasu, M., Mishra, S. K., Panda, P. K., Prasad, R. B. N., Sukla, L. B., & Mishra, B. K. (2011). Screening of Fresh Water Microalgae from Eastern Region of India for Sustainable Biodiesel Production. *International Journal of Green Energy*, 8(6), 669-683. <https://doi.org/10.1080/15435075.2011.588764>
- Oscanoa Huaynate, A., Ynga Huaman, G., Chang Avila, L., & Aguilar Samanamud, C. (2015). Impacto del CO<sub>2</sub> sobre la densidad celular en seis cepas de microalgas marinas. *Revista ION*, 28(2), 23-32. <https://doi.org/10.18273/revion.v28n2-2015002>
- 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>
- 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>
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2013). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of*

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

*Applied Phycology*, 26(3), 1359-1377. [https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9)

[9](#)

Ram, R. M., Debnath, A., Negi, S., & Singh, H. (2022). Use of microbial consortia for broad spectrum protection of plant pathogens. *Biopesticides*, 319-335. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823355-9.00017-1>

Ramsundar, P., Guldhe, A., Singh, P., & Bux, F. (2017). Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. *Bioresource Technology*, 227, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.037>

Rashid, N., Ryu, A. J., Jeong, K. J., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019). Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 196, 640-648. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.05.106>

Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2015). Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(4), 1443-1460.

Rodríguez, J. V. (2008). Análisis de Lípidos de Biomembranas. In Rosario Argentina (Issue March). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4691.1529>

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

Sánchez Alvarado, E. J., León Gómez, S. T., & Vargas Soto, C. A. (2021). Análisis del caso de éxito del proyecto de transformación energética de Islandia (Bachelor's thesis, Especialización en Gerencia de Proyectos-Virtual).

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

- Serrano, L. 2012. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia. Sukenik Assaf, Y. C. T. B. 1989. "Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp". *Journal of Phycology*. 25 (4): 686–692
- Sharma, J., Kumar, S. S., Bishnoi, N. R., & Pugazhendhi, A. (2018). Enhancement of lipid production from algal biomass through various growth parameters. *Journal of Molecular Liquids*.
- Simate, G. (2015). Water treatment and reuse in breweries. *Brewing Microbiology*, 425-456. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-331-7.00020-4>
- Song, C., Hu, X., Liu, Z., Li, S., & Kitamura, Y. (2020). Combination of brewery wastewater purification and CO<sub>2</sub> fixation with potential value-added ingredients production via different microalgae strains cultivation. *Journal of Cleaner Production*, 268, 122332. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122332>
- Tang, C., Gao, X., Hu, D., Dai, D., Qv, M., Liu, D., & Zhu, L. (2023). Nutrient removal and lipid production by the co-cultivation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* in landfill leachate diluted with recycled harvesting water. *Bioresource Technology*, 369, 128496. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128496>
- Tang, C., Gao, X., Hu, D., Dai, D., Qv, M., Liu, D., & Zhu, L. (2023d). Nutrient removal and lipid production by the co-cultivation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* in landfill leachate diluted with recycled harvesting water. *Bioresource Technology*, 369, 128496. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128496>
- Tejada Carbajal, E. M., Martínez Hernández, E., Fernández Linares, L., Novelo Maldonado, E., & Limas Ballesteros, R. (2020). Techno-economic analysis of

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

Scenedesmus dimorphus microalgae biorefinery scenarios for biodiesel production and glycerol valorization. *Bioresource Technology Reports*, 12, 100605. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100605>

Vélez Tamayo, M. J. (2014). Estudio sobre el modelado y control de las condiciones óptimas de cultivo de microalgas en fotobiorreactores para producción de biodiésel.

Yirgu, Z. (2020, 4 diciembre). Nutrient removal and carbohydrate production potential of indigenous *Scenedesmus* sp. grown in anaerobically digested brewery wastewater - *Environmental Systems Research*. SpringerOpen. <https://environmentalsystemsresearch.springeropen.com/articles/10.1186/s40068-020-00201-5>

Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. (2016). Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00557>

Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. (2016). Improved Productivity of Neutral Lipids in *Chlorella* sp. A2 by Minimal Nitrogen Supply. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00557>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

**9. ANEXOS**

Anexo 1

Límites máximos permisibles de parámetros fisicoquímicos para la  
preservación de flora y fauna en agua dulce.

<b>Parámetro</b>	<b>Expresado</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite máximo permisible</b>	<b>Protocolo</b>
<b>Cobre</b>	Cu	mg/L	1	SM 3111-B
<b>Cromo</b>	Cr	mg/L	0.5	SM 3111-B
<b>Hierro</b>	Fe	mg/L	10	SM 3111-B
<b>Oxígeno Disuelto</b>	O. D	mg/L	>60% saturación	SM 4500 O. G
<b>Plomo</b>	Pb	mg/L	0.2	SM 3111-B
<b>Nitrógeno Total</b>	N	mg/L	15	SM 4500 N Kjeldahl
<b>Demanda Química de Oxígeno</b>	DQO	mg/L	250	SM 5220 D
<b>Nitratos</b>	N	mg/L	13	SM 4110-B
<b>Nitritos</b>	N	mg/L	0.2	SM 4110-B
<b>Molibdeno</b>	Mo	mg/L	0.07	SM 3111-B
<b>Níquel</b>	Ni	mg/L	2	SM 3111-B
<b>Sodio</b>	Na	mg/L	200	SM 3111-B
<b>Calcio</b>	Ca	mg/L	30	SM 2340
<b>Fósforo Total</b>	P	mg/L	10	SM 4500-BF
<b>Carbono Orgánico Total</b>	COT	mg/L	No reporta	-

*SM: Estándar Method. Protocolos tomados de American Pharmaceutical Association (APHA, 1992). Fuente: (MAE,2015; TULSMA, 2003)*

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

Anexo 2

Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio cultivadas en agua residual de cerveza.

Crecimiento Celular									
Días	Conteo Celular			Densidad Óptica			Peso Seco		
	Consortio	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> v.	Consortio	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> v.	Consortio	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> v.
0	5,95E+04 ±	1,09E+06 ±	2,60E+06 ±	0,208 ±		0,422 ±	0,016 ±		0,007 ±
	6,63E+02	1,22E+05	5,52E+04	0,006	0,402 ± 0,011	0,001	0,002	0,001	0,006
1	9,98E+04 ±	4,59E+06 ±	7,11E+05 ±	0,342 ±		0,468 ±	0,019 ±		0,006 ±
	5,52+02	1,10E+04	5,52E+04	0,050	0,889 ± 1,012	1,003	0,002	0,002	0,002
2	8,55E+05 ±	5,45E+06 ±	1,10E+06 ±	0,942 ±		0,822 ±	0,019 ±		0,005 ±
	1,10+04	4,42E+04	1,10E+04	0,033	1,070 ± 2,017	2,020	0,009	0,002	0,001
3	8,90E+05 ±	5,73E+06 ±	2,80E+05 ±	1,196		0,989 ±	0,019 ±		0,006 ±
	1,10E+03	4,42E+04	1,10E+03	±0,092	1,074 ± 3,004	3,014	0,020	0,001	0,006
4	8,64E+05 ±	5,71E+06 ±	1,00E+06 ±	1,282 ±		1,012 ±	0,019 ±		0,007 ±
	2,21E+03	1,10E+04	4,42E+04	0,042	1,064 ± 4,009	4,005	0,009	0,001	0,003
5	8,51E+05 ±	6,30E+06 ±	3,47E+05 ±	1,305 ±		1,073 ±	0,019 ±		0,016 ±
	1,44+04	1,31E+06	6,63E+03	0,004	1,085 ± 5,004	5,057	0,003	0,001	0,004
6	9,92E+05 ±	6,89E+06 ±	1,70E+06 ±	1,316 ±		1,101 ±	0,020 ±		0,016 ±
	3,31E+04	6,85E+05	5,52E+04	0,030	0,989 ± 6,005	6,011	0,013	0,004	0,000
7	1,09E+06 ±	7,53E+06 ±	1,27E+06 ±	1,304 ±		1,100 ±	0,023 ±		0,016 ±
	1,10E+03	2,21E+04	8,84E+04	0,008	1,124 ± 7,006	7,003	0,002	0,005	0,010
8	1,12E+06 ±	7,63E+06 ±	2,02E+06 ±	1,309 ±		1,110 ±	0,023 ±		0,016 ±
	1,10E+03	3,31E+04	3,31E+04	0,002	1,085 ± 8,008	8,011	0,002	0,005	0,002
9	1,24E+06 ±	6,73E+06 ±	2,87E+06 ±	1,327 ±		1,098 ±	0,023 ±		0,018 ±
	1,10E+03	1,22E+05	5,52E+04	0,006	1,125 ± 9,008	9,023	0,026	0,005	0,003
10	1,49E+06 ±	6,59E+06 ±	3,09E+06 ±	1,389 ±	1,162 ±	1,050 ±	0,023 ±		0,018 ±
	1,10E+03	1,10E+04	1,10E+04	0,004	10,034	10,005	0,003	0,006	0,006
11	1,53+06 ±	5,67E+06 ±	3,55E+06 ±	1,397 ±	1,257 ±	1,066 ±	0,014 ±		0,019 ±
	2,21E+03	2,21E+04	7,73E+04	0,006	11,005	11,023	0,008	0,007	0,003
12	1,53E+06 ±	5,66E+06 ±	3,50E+06 ±	1,416 ±	1,246 ±	1,065 ±	0,012 ±		0,019 ±
	1,77+04	6,63E+04	1,77E+05	0,018	12,005	12,007	0,002	0,007	0,017
13	1,42E+06 ±		4,91E+06 ±	1,429 ±		1,047 ±	0,017 ±		0,019 ±
	1,20E+05		9,94E+04	0,035		13,013	0,011		0,007

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

Anexo 3

Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y su consorcio en agua residual de cerveza.

DÍAS	Concentración de Nitrógeno, Fósforo y Carbono								
	Nitrógeno Total			Fósforo Total			Carbono Total		
	Consortio	<i>Chlorella v</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	Consortio	<i>Chlorella v</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	Consortio	<i>Chlorella v</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>
0	40,5 ± 0,707	131 ± 4,950	35 ± 1,414	314,5 ± 1768	511,4 ± 11,172	154,2 ± 4,101	835 ± 0,71	896,5 ± 0,707	864,5 ± 0,707
1	34,5 ± 0,07	108 ± 414	26 ± 2,828	244,8 ± 2,263	469,5 ± 16,334	120,2 ± 6,788	834 ± 2,83	889,5 ± 4,95	806,5 ± 7,778
2	34 ± 1,414	88 ± 4,243	21 ± 1,414	111,6 ± 5,940	528,4 ± 10,465	112,7 ± 3,960	794 ± 0,71	895,5 ± 4,95	758,5 ± 14,849
3	32,5 ± 2,121	53 ± 1,414	17,5 ± 0,707	47,4 ± 2,263	281,5 ± 3,253	92,3 ± 17,112	4,24	765,5 ± 888 ± 2,828	709 ± 1,414
4	30 ± 1,414	48,5 ± 2,121	14 ± 1,414	47,5 ± 1,556	215,4 ± 45,538	64,65 ± 0,778	5,66	754,5 ± 881 ± 5,657	663,5 ± 4,950
5	28 ± 1,414	43,5 ± 0,707	13 ± 0,707	49,55 ± 1,626	227,75 ± 6,859	60,3 ± 4,950	640 ± 5,66	883,5 ± 10,607	597 ± 1,414
6	27,5 ± 0,707	43,5 ± 0,707	11,5 ± 1,414	48,4 ± 3,536	221,45 ± 9,970	58,9 ± 5,515	587 ± 7,07	877,5 ± 0,707	476,5 ± 12,021
7	24 ± 0,707	43 ± 0,707	8 ± 0,707	53,1 ± 2,828	251,4 ± 33,517	57,7 ± 0,283	498 ± 7,07	875,5 ± 0,707	331 ± 11,314
8	24 ± 1,414	45,5 ± 2,121	6,5 ± 0,707	51,2 ± 0,849	251,51 ± 32,541	56,05 ± 1,626	6,36	546,5 ± 870,5 ± 2,121	309,5 ± 12,021
9	17,5 ± 2,121	43 ± 2,828	6 ± 1,414	44,3 ± 1,131	247,35 ± 7,283	55,9 ± 0,707	3,54	516,5 ± 878 ± 5,657	289,5 ± 3,536
10	16 ± 0,707	52,5 ± 2,121	5 ± 1,414	42,7 ± 0,566	269,35 ± 4,313	50,2 ± 2,687	2,12	540,5 ± 872 ± 1,414	285,5 ± 7,778
11	15,5 ± 3,536	48 ± 0,707	5 ± 0,707	41,1 ± 0,990	239,05 ± 9,687	45,85 ± 2,051	9,19	530,5 ± 879 ± 5,657	247 ± 4,243
12	10 ± 2,828	48,5 ± 0,707	4 ± 0,707	36,45 ± 1,768	264,75 ± 8,697	43,7 ± 0,707	521 ± 5,66	876 ± 2,828	189,5 ± 2,121
13	4 ± 414	47 ± 2,828		33,85 ± 0,212	334,35 ± 36,699		6,36	532,5 ± 886 ± 4,243	

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO  
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA  
CERVECERA**

Anexo 4

Valores presentados en porcentaje (% m/m)

Proceso	Biomasa	Catalizador	ETANOL	METANOL	AE	CM	MCH	HEXANO
FAMES INDIRECTO	BS	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	74,00	60,00	50,00	78,50	78,50	64,00
		RESINA	0,00	0,00	41,50	0,00	61,00	30,00
	BH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	23,00	32,00	0,00	31,00	0,00	0,00
		RESINA	14,00	30,50	0,00	41,00	0,00	0,00
FAMES AGL	BS	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	63,00	45,50	38,50	70,00	73,50	68,50
		RESINA	0,00	30,00	52,00	0,00	61,00	0,00