

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

“Caracterización de actividad lipasa endógena de especies de microalgas y desarrollo de transesterificación *in situ* para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos, como materia prima para biocombustibles”

"Characterization of endogenous lipase activity of microalgae species and development of *in situ* transesterification for the production of fatty acid methyl esters as biofuel feedstock."

Ph.D. Karla Meneses Montero  
Lic. Francinie Vega Murillo  
Ph.D. Andrés Sánchez Kopper  
M.Sc Maritza Guerrero Barrantes  
Ph.D. Fabián Villalta Romero. Coordinador.

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Enero, 2020. – Diciembre, 2023.

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	11
DATOS GENERALES.....	14
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN .....	17
MARCO TEÓRICO.....	19
METODOLOGÍA .....	35
1. Determinar el rendimiento y perfil químico de los lípidos en las microalgas silvestres <i>I. galbana</i> y <i>Chlorella sp.</i> .....	35
1.1.Cuantificar el rendimiento lipídico de las microalgas <i>I. galbana</i> y <i>Chlorella vulgaris.</i> .....	38
1.2.Implementar un método de cuantificación esteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.....	39
1.3.Implementar un protocolo de extracción de lípidos en la microalga seleccionada con solventes.....	41
1.4.Caracterizar la fracción lipídica de las microalgas <i>I. galbana</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> , mediante cromatografía de gases .....	42
2. Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada .....	42
2.1.Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada .....	42
3. Determinar la actividad lipasa endógena en la cepa seleccionada de microalga .....	43
3.1.Evaluar la actividad lipasa endógena de la cepa con mayor rendimiento lipídico .....	43
3.2.Generar un perfil químico por cromatografía de gases de los lípidos de la microalga seleccionada bajo los mejores parámetros de producción de lípidos y mayor actividad lipasa endógena. ....	43
4. Establecer el protocolo para la producción de FAME <i>in situ</i> a partir de microalgas por la actividad de lipasa endógena .....	44
4.1.Desarrollar el experimento de transesterificación <i>in situ</i> .....	44
5. Determinar la calidad del precursor de biocombustible producido versus la calidad de muestras comerciales .....	45

5.1.....	Análisis	
termogravimétrico .....		45
RESULTADOS .....		46
1.Determinar el rendimiento y perfil químico de los lípidos en las microalgas silvestres <i>I. galbana</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> .....		46
1.1.Cuantificar el rendimiento lipídico de las microalgas <i>I. galbana</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> .....		46
1.2.Implementar un método de cuantificación esteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases .....		47
1.3.Implementar un protocolo de extracción de lípidos en la microalga seleccionada con solventes.....		48
1.4.Caracterizar la fracción lipídica de las microalgas <i>I. galbana</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> , mediante cromatografía de gases .....		49
2.Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada .....		50
3.Determinar la actividad lipasa endógena en la cepa seleccionada de microalga.....		50
3.1.Evaluar la actividad lipasa endógena de la cepa con mayor rendimiento lipídico .....		50
3.2.Generar un perfil químico por cromatografía de gases de los lípidos de la microalga seleccionada bajo los mejores parámetros de producción de lípidos y mayor actividad lipasa endógena .....		51
3.3.Confirmación del perfil químico de los lípidos obtenido por cromatografía de gases en espectrometría de masas.....		51
4.Establecer el protocolo para la producción de FAME <i>in situ</i> a partir de microalgas por la actividad de lipasa endógena.....		53
4.1.Desarrollar el experimento de transesterificación <i>in situ</i> .....		53
5.Determinar la calidad del precursor de biocombustible producido versus la calidad de muestras comerciales .....		54
5.1. Análisis termogravimétrico .....		54
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....		55

RECOMENDACIONES .....	64
AGREDECIMIENTO (opcional).....	64
REFERENCIAS .....	64
ANEXOS .....	76

# DATOS GENERALES

**Código del proyecto**

5401-1510-1024

**Nombre del proyecto**

Caracterización de actividad lipasa endógena de especies de microalgas y desarrollo de transesterificación *in situ* para la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos, como materia prima para biocombustibles.

**Departamento Académico Responsable:** Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología

**Programas Participantes**

- Programa de Energías Limpias (PELTEC).
- Escuela de Química (EQ).
- Centro Nacional De Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot)

**Investigador (a) responsable:** Ph.D. Fabián Villalta Romero (Coordinador)

**Otros investigadores:**

- Ph.D. Karla Meneses Montero
- Lic. Francinie Murillo Vega
- Ph.D. Andrés Sánchez Kopper
- M.Sc Maritza Guerrero Barrantes

**Colaboradores externos**

- José Dualok Rojas Ortiz
- Empresa Holandesa Hashem Bullion Company Pty Ltd.

**Período de Ejecución:** Enero 2020 – Diciembre 2023

## RESUMEN

Las microalgas son una de las fuentes de biocombustibles renovables con alto potencial para los próximos años, debido a sus características favorables respecto a otros cultivos bioenergéticos. Sin embargo, aún se debe generar los conocimientos, las técnicas y la industrialización relacionadas, para reducir el impacto ambiental y el alto costo de la producción convencional de los biocombustibles a partir del aceite microalgal. El objetivo de este estudio fue desarrollar un proceso de transesterificación *in situ* por actividad lipasa endógena de microalgas silvestres de Costa Rica, para la producción de un precursor de biocombustibles alternativos. Las lipasas son enzimas naturales en las microalgas que permiten realizar la transesterificación de los lípidos en la biomasa húmeda, reduciendo costos de secado y extracción del lípido, además prescinde de catalizadores para la producción de la materia prima para biocombustible (ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) o ésteres etílicos de ácidos grasos FAEEs) pues las mismas enzimas de la biomasa pueden conducir esta reacción. El proyecto consistió en seleccionar una cepa de microalga con mayor contenido lipídico, para esta investigación *Isochrysis galbana* mostró el mayor rendimiento lipídico (6.61 mg.gDW<sup>-1</sup>), los lípidos producidos por la microalga fueron transformados en precursores de biocombustibles por medio de la reacción de transesterificación directa enzimática en la biomasa húmeda de *Isochrysis galbana* en las siguientes condiciones temperatura de 30°C, pH 6.5 y concentración de metanol 2 M para generar los FAMEs; lográndose identificar ésteres metílicos de ácidos grasos como el palmitato de metilo (C16:0), palmitoleato de metilo (C16:1), estearato de metilo (C18:0) y el linoleato de metilo (C18:2), principales componentes del biodiesel. Finalmente, el análisis termogravimétrico (TGA) mostró que el precursor de biodiesel a partir de biomasa de *Isochrysis galbana* presentó pérdida de masa en regiones similares a la del estándar de biodiesel. Esta investigación ha permitido dar un paso más en el campo de las bioenergías para generar biocombustibles a pequeña escala. A futuro, los procesos desarrollados podrán ser escalados permitiendo maximizar los rendimientos para aplicarse a proyectos de gran interés (nacional e internacional) posicionando al TEC como una institución innovadora en el ámbito de la bioenergía alternativa.

**Palabras clave:** *Isochrysis galbana*, lípidos, FAMEs, enzimas lipasas.

## **ABSTRACT**

Microalgae are one of the sources of renewable biofuels with high potential for the coming years, due to their favorable characteristics compared to other bioenergy crops. However, it is still necessary to generate the knowledge, techniques, and related industrialization to reduce the environmental impact and high cost of conventional biofuel production from microalgal oil. The objective of this study was to develop an *in-situ* transesterification process using endogenous lipase activity from wild microalgae in Costa Rica, to produce an alternative biofuel precursor. Lipases are natural enzymes in microalgae that enable the transesterification of lipids in wet biomass, reducing drying and lipid extraction costs, and eliminating the need for catalysts in the production of biofuel raw materials (methyl esters of fatty acids (FAMES) or ethyl esters of fatty acids FAEEs), as the biomass enzymes can catalyze this reaction. The project involved selecting a microalgal strain with higher lipid content; *Isochrysis galbana* showed the highest lipid yield in this research (6.61 mg.gDW<sup>-1</sup>). The lipids produced by the microalgae were converted into biofuel precursors through direct enzymatic transesterification reaction in the wet biomass of *Isochrysis galbana* under the following conditions: temperature of 30°C, pH 6.5, and methanol concentration of 2 M to generate FAMES. Methyl esters of fatty acids such as methyl palmitate (C16:0), methyl palmitoleate (C16:1), methyl stearate (C18:0), and methyl linoleate (C18:2), key components of biodiesel, were identified. Finally, thermogravimetric analysis (TGA) showed that the *Isochrysis galbana* biomass biodiesel precursor presented mass loss in regions similar to that of the biodiesel standard. This research has allowed progress in the field of bioenergy to produce small-scale biofuels. In the future, the developed processes could be scaled up to maximize yields for implementation in highly interesting projects (national and international), positioning TEC as an innovative institution in the field of alternative bioenergy.

**Keywords:** *Isochrysis galbana*, lipid, FAMES, lipase enzymes.

# INTRODUCCIÓN

El mundo ha sido testigo de una vertiginosa expansión demográfica, una creciente industrialización y aumento en los medios de transporte. Esto ha provocado un ritmo alarmante en el consumo de combustibles fósiles (como lo son el petróleo, el gas natural y el carbón.) y una drástica disminución de su disponibilidad; al punto en que en menos de medio siglo podríamos encontrarnos al borde de un agotamiento teórico de tales combustibles (Brindhadevi *et al.*, 2021; Chhandama *et al.*, 2021).

La economía y el desarrollo de los países dependen de la disponibilidad de fuentes de energía; las crecientes necesidades energéticas y los problemas geopolíticos, económicos y medioambientales asociados a los actuales recursos energéticos fósiles exigen ampliar la cartera energética con fuentes nuevas y sostenibles (Mendoza *et al.*, 2020). Ante esto han surgido como alternativa los biocombustibles o biocarburantes producidos a partir de materia y residuos orgánicos de diferentes orígenes. Los cuales se plantean además como medios para mitigar el efecto invernadero (Sánchez-Bayo *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2020).

Las microalgas son fuente de una gran diversidad de metabolitos. En años recientes se han sido objeto de múltiples estudios con el fin de aprovecharlas como recursos para el desarrollo de bioproductos en el área nutricional, farmacéutica y energética. En este último sector se ha estudiado la viabilidad de utilizar los ácidos grasos y otros lípidos como materia prima para la producción de biocombustibles (Sun *et al.*, 2020).

En este contexto, las microalgas han surgido como una alternativa superior para la producción de biocombustibles, en comparación con las fuentes de biomasa de primera y segunda generación. Debido a estas dependen de cultivos que requieren grandes extensiones de tierra y un alto consumo de agua, poniendo en duda su sostenibilidad (El-Sheekh *et al.*, 2022; Mulgund *et al.*, 2022); las microalgas presentan ventajas significativas, ya que, poseen estructuras celulares simples, mayor eficiencia fotosintética y productividad (Abdoul-Latif *et al.*, 2021).

*Isochrysis galbana* es una especie de microalga marina. Esta se ha utilizado comúnmente como fuente de alimento en la industria pesquera. Sin embargo, a través de múltiples estudios se ha

comprobado que posee un gran contenido de lípidos y ácidos grasos, lo que la vuelve un sujeto interesante para la producción de biocombustibles (Canovius *et al.*, 2014, Molina- Cárdenas *et al.*, 2020). Por su parte, algunas especies de *Chlorella* presentan la capacidad de almacenar abundante almidón bajo condiciones de estrés, mientras que otras sintetizan lípidos neutros en forma de triacilglicerol (TAG) (Dragone, 2022). En este sentido, se ha reportado que este es uno de los géneros que alberga a las microalgas con mayor contenido lipídico, constituyendo entre 10% y 67% de su peso (Udayan *et al.*, 2022). Particularmente, *Chlorella vulgaris* es una microalga ampliamente utilizada en ensayos para la producción de biocombustibles. (Yadav *et al.*, 2023)

Ante esta decreciente disponibilidad de combustibles fósiles y en la búsqueda de combatir los efectos del cambio climático, es claro que se necesita de fuentes alternativas de combustibles, una de estas son los biocombustibles derivados de la biomasa microalgal. Estudios recientes se enfocan en la transesterificación directa enzimática de ácidos grasos presentes en la biomasa húmeda de microalgas, como método que permita maximizar el aprovechamiento de los diferentes lípidos presentes en la biomasa para obtener FAMES O FAEEs; una de las ventajas que presenta es que no se utilizan catalíticos ácidos ni alcalinos, ya que el trabajo lo realizan las enzimas; específicamente para los efectos de este estudio se realiza con las enzimas endógenas presentes en la biomasa microalgal. Esta metodología permite realizar tanto la extracción con la transesterificación en un solo paso, no hay pérdidas de lípidos polares, no hay costos por el catalítico y en el proceso hay ahorros de energía, como ejemplo no es necesario realizar el secado de la biomasa.

Es por ello, que comprender el metabolismo de los ácidos grasos en las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris*, y cómo estos pueden ser aprovechados como materia prima para el desarrollo de biocombustibles, resulta un tema trascendental a nivel biotecnológico. Para este fin, se planteó: 1. Determinar el rendimiento y perfil químico de los lípidos en las microalgas silvestres *I. galbana* y *Chlorella sp.*, como punto de partida para seleccionar una de las cepas a continuar en estudio (para efectos de esta investigación fue seleccionada la cepa *Isochrysis galbana*). 2. Inducir el aumento productivo de lípidos y 3. Determinar la actividad lipasa endógena en la microalga *I. galbana*. 4. Establecer el protocolo para la producción de FAMES *in situ* a partir de la microalga por la actividad de lipasa endógena (enzimas responsables del metabolismo de los ácidos grasos en *I. galbana*) para obtener una

caracterización del perfil de lípidos esterificados y finalmente 5. Se realizó un análisis termogravimétrico, este ensayo permitió evaluar las propiedades térmicas y la estabilidad del precursor de biocombustible a partir de biomasa microalgal.

## MARCO TEÓRICO

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos eficientes que cuentan con una alta tasa de crecimiento y productividad de biomasa (Camacho-Rodríguez et al., 2020; Chhandama *et al.*, 2021). Son organismos con un gran potencial biotecnológico porque son capaces de sintetizar una variedad de sustancias químicas únicas de valor comercial, como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, ficobilinas, etc., que tienen importantes aplicaciones en las industrias cosmética, nutricional y farmacéutica (Sun *et al.*, 2019; Rodríguez-España *et al.*, 2022).

*Isochrysis galbana* es una especie de microalga fitoflagelada marrón dorada (Bustamam *et al.*, 2021; Gnanakani *et al.*, 2023), haptofita del orden *Chrysomonadales* que se caracteriza por su rápido crecimiento, alta tasa de división y por ser altamente nutritiva (Picardo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Comúnmente, ha sido utilizada como cebo para peces y crustáceos (Wu y He, 2019). Por otro lado, destaca su riqueza en ácidos grasos, así como de carotenoides y otros metabolitos de gran interés a nivel industrial, como la fucoxantina (Fang *et al.*, 2020; Riccio *et al.*, 2022). También, los ácidos grasos pueden ser utilizados como materia prima para el desarrollo de biocombustibles. Se ha reportado que *I. galbana* presenta una buena acumulación de lípidos y una elevada productividad lipídica (0,32-1,60g/L día, entre 7-40% de su biomasa en peso seco) por lo que ha generado interés en este sector como una respuesta alternativa al problema energético (Picardo *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2019). Por su parte *Chlorella* sp, a diferencia del resto de microalgas, corresponde a un género de microalgas verdes que reside en ambientes tanto acuáticos como terrestres y domina el mercado debido a su naturaleza de ser un producto "Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés - "Generally Recognized as Safe") cultivo rápido y de alta producción de biomasa (Widyaningrum & Prianto, 2021). Se han reportado varios compuestos bioactivos producidos por este género, tales como ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, pigmentos y compuestos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2023; Zakaria *et al.*, 2020). Adicionalmente, se destaca su uso para la eliminación de moléculas orgánicas solubles y compuestos con

nitrógeno y fósforo, provenientes de procesos industriales y aguas municipales (Dragone, 2022).

### **Condiciones de cultivo y requerimientos ambientales de las microalgas**

Es bien sabido que, en el cultivo de microorganismos, las condiciones ambientales y nutricionales juegan un papel clave a nivel metabólico. Especialmente en el cultivo de microalgas autotróficas; como *I. galbana* o *Chorela vulgaris*, el crecimiento celular está regulado por la cantidad y calidad de los nutrientes, así mismo, la irradiancia, la temperatura, la salinidad y el pH (Barsanti y Gualtieri, 2014; Safi *et al.*, 2014; Luna, 2023; Jui *et al.*, 2024).

Las condiciones de cultivo influyen tanto en el crecimiento como en la acumulación de lípidos. Es sabido que tanto la luz como la concentración de carbono son factores críticos en la acumulación de biomasa y procesos de biosíntesis (Sun *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2020). La luz es esencial para los organismos autótrofos, desempeña un papel clave en la composición bioquímica y la producción de lípidos de las microalgas (Mulgund, 2022). La intensidad, la longitud de onda y la duración de está determinan la cantidad de energía fotónica utilizada para la fotosíntesis y la propagación de las microalgas (Cao *et al.*, 2019; Chhandama *et al.*, 2021). Con respecto a la longitud, el rango del espectro fotosintético de las algas se sitúa entre 400 nm y 700 nm (Mulgund, 2022). A pesar de ello se ha visto que variaciones dentro de este rango pueden llegar a tener diferentes efectos en el crecimiento de las microalgas. La luz roja favorece un crecimiento más rápido con células más pequeñas y una menor absorción de nutrientes. La luz azul provoca el efecto adverso, además de promover la expresión génica (Chowdury *et al.*, 2020). La longitud de luz verde puede llegar a ser beneficiosa para la acumulación de lípidos (Che *et al.*, 2019).

La intensidad lumínica afecta directamente el crecimiento y la productividad. Aumento en la intensidad favorece el crecimiento celular, intensidades muy bajas pueden producir crecimiento nulo (Alsarayreh *et al.*, 2022). Para la mayoría de las microalgas, la fotosíntesis se satura entre 100 y 500  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , aunque la productividad máxima se obtiene en los valores de irradiancia media (IA) cercanos a la irradiancia constante en el rango de 50 - 100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Chowdury *et al.*, 2020). Se ha observado que las concentraciones máximas de productividad lipídica de las microalgas oleaginosas se presentan a intensidades de luz fluctuante alta (Zhu *et al.*, 2022).

Las microalgas necesitan un régimen de luz/oscuridad para realizar una fotosíntesis productiva. La luz es necesaria para que la fase fotoquímica produzca adenosín trifosfato (ATP)

y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH). La oscuridad es necesaria para que la fase bioquímica sintetice moléculas esenciales para el crecimiento (Salama *et al.*, 2018).

Se ha observado que en ambientes enriquecidos de CO<sub>2</sub>, se presentan mayores rendimientos biomasa, y una mayor saturación de los ácidos grasos sintetizados, lo que se ha asociado a una mayor disponibilidad de carbono para las células. (Picardo *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2016).

Por otro lado, la temperatura influye directamente en el crecimiento, la acumulación de lípidos y la composición de ácidos grasos (Cao *et al.*, 2020). La tasa de crecimiento celular mejora con el aumento de la temperatura hasta alcanzar un rango óptimo; en microalgas este suele encontrarse entre los 14 °C y 35 °C (Sun *et al.*, 2018). Para cultivos de *I. galbana* se reporta que los máximos valores de concentración de biomasa han sido obtenidos a los 14 °C (Aussant *et al.*, 2018). Las altas temperaturas afectan el metabolismo y la composición lipídica de *I. galbana*, así como múltiples procesos biológicos como el ciclo de Krebs (TCA), la formación de ácidos orgánicos y la fotosíntesis (Su *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2020). En el caso de *Chlorella vulgaris* puede crecer en un amplio rango de temperaturas (25°C-35°C), la temperatura óptima para producir la máxima cantidad biomasa y lípidos fue de 30°C, con valores de 394 mg/L y 6.07 mg/L\*d respectivamente después de 7 días de cultivo en lote (Mohammad *et al.*, 2016).

El pH desempeña un rol importante en el metabolismo energético, la estructura y la función de los orgánulos celulares, las enzimas y las proteínas (Chhandama *et al.*, 2021). *Isochrysis galbana* es capaz de crecer en un amplio rango de pH. Lo que se debe a su capacidad de transportar carbono inorgánico en presencia de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y, a que es capaz de mantener la concentración de carbono intracelular en el rango de pH marino (Picardo *et al.*, 2013). Sin embargo, algunos estudios indican que el pH óptimo es cercano al equilibrio en un rango entre 7,5 y 8,5, con un máximo del crecimiento al acercarse a 8 (Hinga, 2002; Jaiswal *et al.*, 2020; Chhandama *et al.*, 2021). *Chlorella vulgaris* mostró un máximo rendimiento de crecimiento y producción de lípidos en un ambiente alcalino (pH de 9 a 10) con una densidad celular aproximadamente de 16 Mcell/mL (Khalil *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2014).

La mezcla juega un papel clave en el equilibrio de gases y pH del sistema. Una turbulencia suficiente de los cultivos de microalgas minimiza la existencia de gradientes que pueden limitar el rendimiento de las células (Chowdury *et al.*, 2020). Con respecto a la agitación, se menciona que la tasa óptima de agitación se encuentra en un rango entre los 50 - 400 rpm con una tasa de respiración de 0,2-1,0 vvm (Verma *et al.*, 2020). Se observó que en los sistemas de cultivo

en raceway agitados por paletas, el crecimiento diario del cultivo de *Isochrysis galbana* era el doble en comparación con el sistema sin agitación ( $8,8 \times 10^5$  y  $4,0 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> ·d<sup>-1</sup>). En *Chlorella vulgaris* se observó que al ser cultivada en estanques de 2000 L se alcanzaron productividades de biomasa y lípidos entre 20 y 26 g/m<sup>2</sup> d<sup>-1</sup> y 6.1 g/m<sup>2</sup> d<sup>-1</sup> respectivamente y se favoreció un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados (C14-C18) en comparación con los ácidos grasos obtenidos en volúmenes de 1 L (Ramírez *et al.*, 2019). Específicamente para *Isochrysis galbana* otro factor a considerar es la salinidad, pues esta afecta el crecimiento, la morfología y la fisiología de las microalgas, así como la proporción de ácidos grasos (Nedbalová *et al.*, 2016; Salama *et al.*, 2018). Las microalgas pueden cultivarse en una amplia gama de medios acuáticos con diferentes niveles de salinidad (Zarrinmehr *et al.*, 2019).

### **Requerimientos nutricionales y medio de cultivo**

De igual forma los nutrientes en el medio cumplen un rol clave para el metabolismo y el crecimiento microbiano (Sun *et al.*, 2018). Si bien la respuesta a nutrientes es específica a cada especie, se ha reportado que nutrientes como el nitrógeno, el fósforo y el hierro tienen gran influencia en la replicación celular y en el perfil de ácidos grasos (Fernández *et al.*, 2016; Picardo *et al.*, 2013). En cuanto al nitrógeno, este es considerado como un macronutriente primario en el crecimiento de las microalgas, la síntesis clorofílica y ser un componente de los aminoácidos, el ATP, el ADP y el material genético (Song *et al.*, 2018; Camacho-Rodríguez, *et al.*, 2020).

La forma en que el nitrógeno se incluye en el medio puede llegar a tener influencia en la densidad celular y la concentración de lípidos. Al utilizar nitratos como fuente de nitrógeno, se han obtenido mayores rendimientos debido a la mayor disponibilidad en el medio (Picardo *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2019). Por otro lado, Fidalgo *et al.* (1998) y Verma *et al.* (2020) reportaron que al comparar diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de ácido docosaheptaenoico (DHA), la urea fue la fuente más adecuada al permitir una mayor acumulación de ácidos grasos. El fósforo, por su parte, es un componente esencial para procesos de almacenamiento y liberación de energía. El hierro y las vitaminas son elementos clave en la actividad de enzimas como las elongasas y las desaturasas que tienen importancia en el perfil de ácidos grasos (Das *et al.*, 2006; Chen *et al.* 2018). La ausencia de metales traza como el molibdeno, el cobalto y el magnesio afecta negativamente la tasa de crecimiento (Picardo *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2020).

La concentración de los nutrientes también tiene implicaciones en el metabolismo de las microalgas. Este factor ha sido considerado como el más importante para mantener una tasa de crecimiento alta y una biomasa elevada (Sun *et al.*, 2018). A bajas concentraciones de nutrientes se presenta una posible interrupción de los patrones de desaturación y elongación, por lo que los ácidos grasos son más adecuados para la producción de biodiesel (Fernández *et al.*, 2016). Se ha visto que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo repercute en el contenido lipídico. La presencia de nitrógeno favorece el desarrollo de biomasa, mientras que una depleción de este puede llegar a favorecer la expresión de enzimas asociadas a la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados y la acumulación de lípidos en microalgas (Fernández *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2020). Sin embargo, una limitación de nitrógeno puede provocar daños en el aparato fotosintético (Babu *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2018).

### **Mantenimiento de la cepa**

En la literatura múltiples protocolos se han descrito para la conservación y cultivo de microalgas. Estos suelen implicar el cultivo en Erlenmeyer sellados con *Parafilm* mantenidos en incubadora o en un cuarto de crecimiento (Zhang *et al.*, 2020, Moran *et al.*, 2020). Usualmente, los cultivos se mantienen bajo un régimen de luz de 12h luz/12h oscuridad o 18h luz/6h oscuridad; con un rango de intensidad lumínica de entre 5000 - 6500 lux (70-90  $\mu\text{mol}$  fotones /  $\text{m}^2$  s aproximadamente) usando como fuente bombillas fluorescentes (Picardo *et al.*, 2013, Cao *et al.*, 2020). Para el desarrollo de *I. galbana* se han utilizado diversidad de medios de cultivo para microalgas y micro autótrofos (Guillard y Ryther, 1962, Devos *et al.*, 2006; Balduyck *et al.*, 2019; Wu y He, 2019; Cao *et al.*, 2020). Algunos autores los han enriquecido mediante la adición de agua marina artificial, sal marina o mezclas comerciales de nutrientes (Picardo *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2020). También, se ha reportado la adición de antibióticos y un efecto promotor de las microalgas. En *I. galbana* se observó que bajas concentraciones de oxitetraciclina (OTC) y de cloranfenicol promueven el crecimiento (Campa-Cordova *et al.*, 2006; Wu y He, 2019). Por otro lado, se menciona que los cultivos deben mantenerse bajo condiciones aerobias. Los matraces pueden ser gasificados mediante el uso de compresores que permitan el ingreso de aire filtrado (Picardo *et al.*, 2013).

### **Tipos de cultivo**

De acuerdo con la procedencia del carbono para el metabolismo de las microalgas, se suelen distinguir tres tipos o modos de cultivo: autotrófico, heterotrófico y mixotrófico.

Cultivo autotrófico: En el modo de cultivo fotoautótrofo, las microalgas utilizan  $\text{CO}_2$  y  $\text{NaHCO}_3$  como fuente de carbono inorgánico para producir metabolitos orgánicos mediante fotosíntesis (Zhu *et al.*, 2022). En sistemas de cultivo abierto este modo de cultivo contribuye a la reducción global de  $\text{CO}_2$  al consumir el  $\text{CO}_2$  atmosférico (Wayne *et al.*, 2022). El metabolismo autótrofo puede dividirse en dos categorías: fotoautótrofa, o quimioautótrofa. Esto de acuerdo si se utilizan como fuente de energía la luz o la oxidación de compuestos inorgánicos (Gharabaghi *et al.*, 2015).

Cultivo heterotrófico: En el modo heterótrofo, las microalgas asimilan moléculas orgánicas como la glucosa o el glicerol como fuente de carbono y/o energía (Zhu Z *et al.*, 2022). El método heterotrófico puede considerarse el más viable a nivel productivo, porque se genera una mayor productividad de biomasa y lípidos permitiendo mayores ganancias. A pesar de ello cuenta con problemas importantes en la etapa de escalamiento como puede ser el riesgo de contaminación y el alto costo del sustrato (Wayne *et al.*, 2018).

El cultivo mixotrófico: Representa un modo especial en el cual las microalgas tienen la capacidad de metabolizar tanto fuentes de carbono orgánico como inorgánico utilizando energía solar simultáneamente (Wayne *et al.*, 2018). Este enfoque se vislumbra como una estrategia ideal para la producción de lípidos en microalgas a gran escala, aprovechando las ventajas combinadas del cultivo fotoautotrófico y heterotrófico (Zhu *et al.*, 2022).

### **Sistemas de cultivo de la microalga**

Sistema de cultivo en estanque abierto: Los sistemas de estanque o de canalización son un sistema de cultivo que consiste en un canal cerrado expuesto al ambiente; usualmente de 0,25-0,40 m de profundidad en el que un sistema de mezcla permite la recirculación del agua. Una ventaja de este sistema es que recursos como  $\text{CO}_2$ , nutrientes y agua pueden ser adquiridos a bajo coste permitiendo reducir los costos de la producción de biocombustible de microalgas (Srivastava, *et al.*, 2020). En estos sistemas se explota la capacidad que tienen las microalgas para metabolizar luz solar lo que favorece su viabilidad económica (Chhandama *et al.*, 2021).

Sistemas de cultivo cerrados (Fotobiorreactores – PBRs): Los fotobiorreactores son sistemas alternativos a los estanques que consisten en recipientes cerrados en los que se provee a la

biomasa de luz y nutrientes. Un sistema de PBRs, puede consistir en un conjunto transparente de tubos o placas en el que se encuentra el medio y un depósito central desde el que circula el cultivo de microalgas (Srivastava, *et al.*, 2020; Chhandama *et al.*, 2021).

Los PBRs pueden ser sistemas verticales u horizontales. Los fotobiorreactores verticales tienden a tener una mayor producción de biomasa, mayor eficiencia fotosintética media y las mayores productividades volumétricas (Wayne *et al.*, 2018). Dentro de los modelos verticales se encuentran los sistemas “airlifts” y los de columna de burbuja. Una de las ventajas de este sistema de cultivo es que tanto el diseño como los parámetros ambientales: la temperatura, la intensidad luminosa y la composición del medio de cultivo, pueden manipularse para optimizar la productividad global de la biomasa (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2020). En un fotobiorreactor es posible generar mayores cantidades de biomasa porque la relación entre superficie y volumen es mayor que en los sistemas abiertos (Gharabaghi *et al.*, 2015). Asimismo, estos requieren menor espacio y permiten una rápida generación y propagación de las células (Chhandama *et al.*, 2021). Sin embargo, estos sistemas pueden llegar a ser más costosos y requerir una mayor demanda energética. (Srivastava, *et al.*, 2020). De igual forma, pueden presentar problemas como “bio-fouling”, sobrecalentamiento, y alta acumulación de oxígeno disuelto que resulta en la limitación del crecimiento (Narala *et al.*, 2016)

Una versión alternativa de los fotobiorreactores tradicionales son los biorreactores de tanque agitado, este sistema deriva del diseño del tanque de fermentación añadiendo una fuente de luz externa. El reactor utiliza un agitador para promover la mezcla del medio de cultivo, optimizando la transferencia de calor y masa. proporciona una buena mezcla y la adición de aireación podría proporcionar una mejor solubilidad del gas (Wayne *et al.*, 2018).

#### Enfoques de cultivo por lotes, continuo y semicontinuo

El cultivo por lotes es una estrategia en la que las microalgas se cultivan bajo condiciones predeterminadas en un volumen de medio específico. Es el sistema más sencillo y fiable; aunque presenta inconvenientes como un agotamiento acelerado de los nutrientes y autosombreado celular (Eldiehy *et al.*, 2022).

El cultivo continuo es una alternativa bien establecida y atractiva al método por lotes. El suministro de nutrientes, incluyendo la concentración y la fuente de los principales nutrientes, es una cuestión crítica para el cultivo de microalgas que contribuye significativamente a la productividad de la biomasa, el valor nutricional y los costos de producción (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2020).

Este tipo de enfoque suele observarse dividido en dos etapas: la primera en la que se provee al cultivo de abundantes nutrientes para maximizar la biomasa; y la segunda en la que se aplican condiciones de estrés que favorezcan la acumulación de los lípidos. Sin embargo, el factor de estrés escogido puede implicar un aumento en costo de producción, por lo que a nivel industrial se recomienda centrarse en condiciones de estrés ambiental (Zhu *et al.*, 2022).

### **Lípidos en *I. galbana* y *C. vulgaris*.**

En las microalgas los lípidos pueden clasificarse en neutros (acilgliceroles, esteroides, ceras, ácidos grasos libres) y en polares, algunos autores separan este último en glicolípidos y fosfolípidos) (Devos *et al.*, 2006; Grima *et al.*, 2013; Che *et al.*, 2019). Los lípidos neutros, principalmente los triacilgliceroles (TAG), se acumulan como gotas en el citosol, mientras que los polares están situados en las membranas (Mimouni *et al.*, 2018; Señorans *et al.*, 2020). Los lípidos de las microalgas desempeñan tres funciones principales: (1) almacenar energía para su uso posterior, (2) actuar como componentes estructurales de las membranas celulares y (3) moléculas de señalización para la comunicación celular (Mulgund, 2022).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadena larga que sirven como materia prima crucial para los aceites y afectan directamente a sus propiedades y funciones (Bhagea *et al.*, 2022). Los ácidos grasos pueden dividirse en ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados (AGI). Los ácidos grasos que carecen de dobles enlaces carbono-carbono en la cadena alifática se denominan ácidos grasos saturados, que incluyen el ácido palmítico y el ácido esteárico, entre otros. Los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) son ácidos grasos de cadena recta con dos o más dobles enlaces.

Dentro de los ácidos grasos se ha detectado la presencia de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido estearidónico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido araquidónico (Señorans *et al.*, 2020). Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados representan alrededor del 80 % en peso de los ácidos grasos, a pesar de ello, la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados les confiere a los lípidos de las microalgas excelentes propiedades como biocombustibles a bajas temperaturas (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020).

La composición lipídica depende de múltiples factores como la especie, el tiempo o edad (fase de crecimiento) y las condiciones de cultivo (Grima *et al.*, 2013; Bonfati *et al.*, 2018). Se ha observado que durante la fase exponencial se favorece la acumulación de lípidos polares como los fosfolípidos mientras que en la estacionaria se acumulan triglicéridos (Picardo *et al.*, 2013).

Toda esta diversidad de compuestos saponificables de *I.galbana* puede ser aprovechados mediante la transformación en (ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020), o incluso en ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs) (Mendoza *et al.*, 2020). El perfil lipídico de *C. vulgaris* está constituido principalmente por ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono (Coronado-Reyes *et al.*, 2022), de los cuales el 70,18% corresponde a ácidos grasos saturados, el 16,85% representa ácidos grasos monoinsaturados y el 8,72% concierne a ácidos grasos poliinsaturados (Shanmugam *et al.*, 2020).

### **Metabolismo de los lípidos**

En las microalgas, la producción de lípidos tiene lugar principalmente en la membrana plasmática, las endomembranas, los cuerpos lipídicos y el cloroplasto, donde se produce la biosíntesis *de novo* de lípidos algales. En la biosíntesis de estas moléculas intervienen tres procesos primordiales la síntesis *de novo* de ácidos grasos en el cloroplasto, el ensamblaje de glicerolípidos en el retículo endoplásmico (RE) y el empaquetamiento final de los lípidos en los cuerpos oleosos (Mulgund, 2022).

El metabolismo de los lípidos está determinado por la actividad de varios grupos enzimáticos como las lipasas, enlongasas y desaturasas. Por ejemplo, la actividad de la TAG lipasa es la responsable de degradar lípidos neutros como el triacilglicerol (TAG) en ácidos grasos y diacilglicerol (Cao *et al.*, 2020). Por otro lado, las enlongasas y desaturasas son los grupos responsables de definir el grado de insaturación y la longitud de la cadena de los ácidos grasos (Fernández *et al.*, 2016).

Los ácidos grasos saturados y los monoinsaturados son sintetizados *de novo* en el cloroplasto, proporcionando los sustratos necesarios para la biosíntesis de los poli-insaturados en el retículo endoplásmico (Fernández *et al.*, 2016). En este proceso, los azúcares son utilizados como fuente para la producción de ácido pirúvico, que se convierte en acetil CoA a través del ciclo del ácido cítrico, siendo esta molécula usada como materia prima para la producción de lípidos y ácidos grasos (Verma *et al.*, 2020). En esta ruta el acetil CoA es convertido a malonil-CoA por la actividad de enzimas carboxilasas. Esto da inicio a que se formen ácidos grasos saturados, que al atravesar una serie de reacciones de desaturación y elongación forman ácidos grasos insaturados.

### **Valorización y uso de los lípidos**

Los biocarburantes son un recurso energético que captura la energía solar como energía química en los enlaces de materiales producidos biológicamente. Se producen a partir de materia orgánica y residuos como lignocelulosa seca, algas, levaduras, grasas de restaurantes, cereales alimentarios, cereales no alimentarios y grasas animales (Srivastava *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2022).

Los lípidos de microalgas han adquirido interés como posibles fuentes de productos nutritivos y materia prima en el desarrollo de biocombustibles para satisfacer la demanda de nuevas fuentes de combustibles (Canovius *et al.*, 2014, Sánchez-Bayo *et al.*, 2020). Los ácidos grasos saturados y mono-insaturados tienen el potencial para ser aprovechados en la producción de biodiesel (Fernández *et al.*, 2016).

Las ventajas de los biocombustibles basados en microalgas sobre los de materias primas de primera (soja y cultivos), y segunda generación (jatrofa) incluyen un mayor rendimiento por unidad de superficie, la producción de diversos productos finales de combustible (como biodiésel, bioetanol, biobutanol y biohidrógeno) y el potencial de crecimiento a gran escala que demanda menos agua que los cultivos terrestres (Langholtz *et al.*, 2016; Salama *et al.*, 2018).

En especial el biodiesel sintetizado como ésteres metílicos ha sido un punto de interés porque cuenta con múltiples propiedades que lo convierten en una alternativa eficiente a los combustibles tradicionales pues es un buen lubricante y tiene un alto punto de inflamación. Chhandama *et al.*, 2021).

Al desarrollar biocombustibles se debe valorizar el residuo de biomasa generado con el fin solventar los costos que implica (Srivastava *et al.*, 2020). Por ello las microalgas han resultado de gran atractivo pues además de ser altamente productivas, se le puede dar fácilmente a su biomasa un valor añadido (Blanco-Llamero *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2022). En el caso de *I. galbana* se ha reportado que esta puede servir como materia prima para la digestión anaerobia y la producción de biogás. (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020). Por otro lado, la biomasa también puede utilizarse como antioxidante en el tratamiento de trastornos como la aterosclerosis y la diabetes (Balduyck *et al.*, 2019).

El cultivo de microalgas permite obtener otros bioproductos valiosos como aditivos, vitaminas, pigmentos, compuestos farmacéuticos y cosméticos (Allemann y Allen, 2018; Islam *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2020). *Isochrysis galbana* representa una rica fuente de omega-3, concretamente ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) lo

que la hace especialmente atractiva en la industria alimentaria (Bonfati *et al.*, 2018). De igual forma estos compuestos se consideran beneficiosos para la salud; el DHA es muy importante en la gestación, ya que es responsable del desarrollo del cerebro y de las funciones visuales del feto (Lemahieu *et al.*, 2016; Balduyck *et al.*, 2019).

Los nutraceuticos derivados de microalgas se han convertido en una tendencia creciente en la industria alimentaria, esto por la propiedad que poseen los ácidos y otros metabolitos presentes en ellas. Por esto recientemente, *I. galbana* se ha comenzado a agregar como suplemento en alimento como galletas, pastas y yogurt (Matos *et al.*, 2021; Moran *et al.*, 2022; Luna, 2023). Dentro del área cosmética se han incorporado lípidos de microalgas en formulaciones de cremas y lociones para el cuidado de la piel. En *I. galbana* se ha estudiado la posibilidad de utilizar sus galactoglicéridos en formulaciones para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel tipo “psoriasis”. (Rodríguez-Luna *et al.*, 2018). Asimismo, se ha visto que sus ácidos grasos pueden ser utilizados como nutraceutico porque presenta propiedades antiinflamatorias y reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Lemahieu *et al.*, 2016, Bonfati *et al.*, 2018).

A nivel farmacéutico, *Isochrysis galbana* ha llamado la atención de múltiples investigadores porque se ha observado la capacidad antiinflamatoria de sus glicolípidos. Además, de una posible citotoxicidad contra células cancerosas HeLa por la presencia de betaglucanos, por lo que su biomasa puede tener potencial anticancerígeno contra células mieloides (Wong *et al.*, 2022).

Todos estos compuestos y aplicaciones le dan un valor añadido a la producción de biocombustibles. Lo que implica la posibilidad de llevar a cabo una producción integrada de múltiples metabolitos, mejorando la viabilidad económica de la producción de biocombustibles a partir de *I. galbana* (Sun *et al.*, 2019).

## **Procesamiento de biomasa microalgal después del cultivo**

### Recolección y almacenamiento de la biomasa

Una vez finalizado el cultivo, la biomasa es cosechada y concentrada. Existen múltiples métodos para recolectar la biomasa de microalgas floculación-sedimentación, centrifugación, filtración y flotación, la coagulación, la electrocoagulación y métodos híbridos (Alsarayreh *et al.*, 2022).

La centrifugación es el método más ampliamente utilizado a nivel comercial dado que permite recuperar biomasa de alta densidad y tiene la capacidad de permitir una concentración y

separación de microalgas de alta calidad (Wang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2023). La centrifugación presenta tasas de recuperación de hasta el 90% o superiores (Alsarayreh *et al.*, 2022). Una vez cosechada es almacenada como biomasa húmeda o seca; esta última requiere que la biomasa sea filtrada y desecada en un horno a altas temperaturas para luego ser almacenada a temperatura bajo cero (Sun *et al.*, 2019; Molina-Cárdenas *et al.*, 2020).

Uno de los problemas más comunes en el almacenamiento de la biomasa es la lipólisis. Este es un proceso en el que las lipasas endógenas de la microalga generan reacciones lipolíticas que provocan que los ácidos grasos se desprenden de las columnas vertebrales de los triacilgliceroles, fosfolípidos y glicolípidos, formando ácidos grasos libres. Este es un problema especialmente importante en la producción de biocombustibles ya que estos disminuyen la estabilidad de los lípidos y pueden llevar a una menor eficacia y a aumentar los costos de producción (Balduyck *et al.*, 2019).

Una forma de prevenir estas reacciones lipolíticas es mediante una inactivación temprana de las lipasas mediante un tratamiento de calor. En *I. galbana* se ha reportado que la inmersión de la biomasa en agua hirviendo puede reducir la actividad de las lipasas y el contenido de ácidos grasos libres (Balduyck *et al.*, 2019).

## **Extracción de los lípidos**

### Pretratamientos de la biomasa y métodos de extracción

Los lípidos pueden ser extraídos a partir de biomasa húmeda o seca. En este último, la biomasa recuperada se somete a un proceso de liofilización para homogeneizar la muestra. (Verma *et al.*, 2020). En la extracción por vía seca se reportan mayores rendimientos, sin embargo, también se menciona que en la producción de biodiesel es óptimo el uso de biomasa húmeda porque permite recuperar mayores concentraciones de lípidos saponificables (Zarrinmehr *et al.*, 2019; Sánchez-Bayo *et al.*, 2020).

Varias especies de microalgas poseen una pared celular celulósica gruesa y rígida que puede reducir la bioaccesibilidad por lo que es vital realizar una disrupción celular. Este puede ser llevado a cabo mediante ultrasonificación o mediante el método enzimático en el que se utilizan una serie de lipasas y celulasas capaces de degradar polisacáridos como celulosa, manosa, algaenano y glicoproteínas de la pared microalgal (Lee *et al.*, 2012; Señorans *et al.*, 2020).

Sin embargo, diversos autores han discutido la existencia de pared celular en *I. galbana*, ya que se han obtenido resultados indiferentes al aplicar o no métodos de disrupción previos a la

extracción (Lemahieu *et al.*, 2016). Otros directamente afirman que dicha microalga no posee una pared lo que hace especialmente sencillo el proceso de extracción (Sun *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, la extracción de lípidos se ha realizado mediante el uso de disolventes orgánicos (Señorans *et al.*, 2020). Este método de extracción conlleva una separación bifásica, en la que las moléculas no lipídicas como proteínas y carbohidratos se acumulan en una fase acuosa; y los lípidos neutros y polares se disuelven principalmente en una orgánica (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020).

La selección del disolvente es un factor clave para aumentar la recuperación y mantener la calidad de los lípidos extraídos. A nivel de microalgas para la recuperación de lípidos, suele utilizarse hexano o el método de “Bligh y Dyer” en el que se toma como disolvente una mezcla de cloroformo-metanol (Canovius *et al.*, 2014; Balduyck *et al.*, 2019; Sánchez-Bayo *et al.*, 2020). A pesar de esto en la literatura se han descrito otra diversidad de opciones como el isopropanol, hexano-etanol y el acetato de etilo (Lemahieu *et al.*, 2016). Este último, tiene como ventaja que permite la producción conjunta de biogás y de biodiesel a partir de los residuos de biomasa y los lípidos extraídos de *I. galbana* (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020)

La selección del método de extracción es importante ya que se ha observado que de acuerdo con la misma se pueden obtener diferencias en la composición de los ácidos grasos y lípidos recuperados. Una vez extraídos los ácidos grasos se realiza la transesterificación. Este es un proceso en el que los ácidos grasos se metilan mediante un catalizador ácido y se convierten directamente en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) o ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs) con el fin de poder ser analizados (Canovius *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2023). La composición lipídica se puede determinar mediante cromatografía en capa fina o cromatografía de gases (Balduick *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2020).

### **Reacción de transesterificación.**

El biodiésel, también llamado éster metílico o etílico de ácido graso (FAME o FAEE) por sus siglas en inglés, es un biocombustible producido por la transesterificación química de ácidos grasos (Demirel, 2018; Velasco, 2017). Actualmente se estudian fuentes alternativas de biocombustibles y las microalgas son una de las fuentes más promisorias. Su estudio para el sector bioenergético inició en 1950, y la generación de tecnologías se aceleró a partir del 2008, tanto en América, Europa y China; se estima que estos países han invertido cerca de 450 millones de dólares en investigación en los últimos 10 años (Newswire, 2015; Su *et al.*, 2017), alcanzando una curva de aprendizaje sobre estas tecnologías que permitirá, al 2035, la

comercialización del biocombustible a partir de microalgas a un precio competente respecto al combustible fósil (Hubert *et al.*, 2016).

En las microalgas y otras fuentes, los ácidos grasos se pueden encontrar en la forma de triacilglicerol (ligadas a una molécula de glicerol), por lo que, se cataliza la disociación de los FAMES o FAEEs del glicerol con hidróxidos solubles en el alcohol (NaOH, KOH); sin embargo, se obtienen materias primas con menor calidad (mayor contenido de agua, ácidos grasos libres y jabones), con un costo alto de producción y generación de residuos contaminantes. La producción de FAMES o FAEEs emplea los lípidos que han sido extraídos de la biomasa en pasos anteriores con solventes como alcohol y metanol, entre otros, con una elevada huella de carbono en el proceso (Demirel, 2018; Mata *et al.*, 2010). Como alternativa al proceso convencional, muchas investigaciones a partir del 2001 se han enfocado en catalizar la reacción directamente en la biomasa húmeda, tratando de encontrar catalizadores eficientes en medios acuosos, entre ellos la reacción enzimática con lipasas del tipo acil-transferasas, que ha sido una de las mejores alternativas estudiadas, con el inconveniente del costo de las enzimas comerciales (Cuadro 1). (Kareem *et al.*, 2017)

**Cuadro 1.** Comparación de la catálisis alcalina y enzimática en la producción de FAME.

Catálisis	Temperatura	Agua	Rendimiento	Purificación	Jabón	Costo
Alcalina	60-70 °C	Interfiere	Normal	Lavados	Se produce	Bajo
Enzimática	30-40 °C	No influye	Alto	Ninguna	No produce	Alto

Recientemente se investigan procesos de transesterificación de los lípidos microalgales, empleando lipasas fúngicas y bacterianas, entre otras, para obtener biocombustibles. En un estudio emplearon una cepa de *Chlorella* sp. que contenía 41% de lípidos, para producir FAME utilizando un método de extracción con carbonato de dimetilo (DMC) y Novozyma 435, obteniendo un 37 % de rendimiento y menos de 1 % de glicerol residual. Rendimientos de hasta 90% y ausencia de glicerol se obtuvieron con la microalga *Aurantiochytrium* sp. empleando lipasas exógenas (Kim *et al.*, 2016).

Aún más interesante que el uso de enzimas comerciales, se han descrito recientes investigaciones que explotan especies de microalgas con alta actividad de lipasas endógena, que posterior a la cosecha de la biomasa, podrían catalizar la reacción de transesterificación *in situ*, sin importar que la biomasa presente un grado de humedad de hasta 20%, por lo que los procesos de secado, extracción de los lípidos y recuperación del solvente de extracción son

obviados y el costo de producción de los biocombustibles se reduce hasta un 40% respecto al proceso tradicional (Guldhe *et al.*, 2015).

Una alta producción de lípidos y alta actividad lipasa endógena son dos factores que debe cumplir la cepa de microalga a emplear para un proceso productivo de FAME o FAEE (Rodríguez *et al.*, 2016). *Isochrysis galbana* y *Chlorella* sp. se han propuesto como materia prima para la industria de biodiesel y recientemente se informa sobre alta actividad lipolíticas endógena que potencia el uso de estas cepas en aplicaciones biotecnológicas bioenergéticas novedosas (Hubert *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2019).

Las variables para tomar en cuenta en la reacción enzimática endógena es la fase de reacción, donde la enzima soluble en agua debe entrar en una fase tipo emulsión donde pueda acceder el sustrato lipídico. Para maximizar el contacto enzima sustrato, se induce la disrupción de la pared celular de las microalgas mediante ultrasonido o microondas, choques osmóticos, entre otras técnicas (Skorupskaite *et al.*, 2016). Las temperaturas ideales reportadas para la reacción no deben sobrepasar los 40 °C y deben ser mayores a 20 °C para que la reacción suceda eficientemente, y como en la catálisis tradicional, el pH debe ser inferior a 6.5 y mayor a 5. La concentración de alcohol debe guardar una relación con la cantidad de sustrato y enzima, pues concentraciones mayores a la relación molar alcohol y aceite 1:5 se traducen en la inactivación del enzima responsable del proceso (Guldhe *et al.*, 2015; Kareem *et al.*, 2017).

### **Métodos de caracterización de lípidos**

La caracterización de la fracción lipídica tiene el fin de evaluar la recuperación total de lípidos y el diferente fraccionamiento de lípidos polares y no polares de extractos de microalgas (Señorans *et al.*, 2020). Generalmente, estos análisis se llevan a cabo mediante técnicas cromatográficas, en los que los componentes se separan físicamente y se distribuyen entre dos fases (De Almeida *et al.*, 2013).

En el caso de los lípidos estos suelen separarse y cuantificarse mediante cromatografía de gases (GC) (Sun *et al.*, 2018) Una ventaja de usar esta técnica es que permite obtener información sobre la composición de los ácidos grasos al caracterizar ésteres alcohólicos volátiles y hace uso de estándares auténticos relativamente baratos (Breuer *et al.*, 2013; Pourseyed *et al.*, 2020). La GC cuenta con la facilidad de unidades de detección de ionización de llama (FID) o captura de electrones (Kiani *et al.*, 2022). El FID es una herramienta robusta altamente sensible y con respuesta lineal en la detección de compuestos orgánicos como los ácidos grasos. Se destaca por su costo y mantenimiento mínimos. El FID funciona mediante la detección de cationes de

hidrocarburos producidos dentro de una llama de hidrógeno a la salida de la columna de GC (Spanjers *et al.*, 2017).

Otras dos plataformas analíticas comunes son la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía líquida (LC) (Fernández *et al.*, 2016). A pesar de ello, la GC se considera una técnica más sensible y robusta; además de que la LC tiene menos éxito en la cuantificación de ácidos grasos debido a la ausencia de cromóforos o grupos funcionales fluorescentes (Zhang *et al.*, 2015). Otras técnicas de análisis y caracterización involucran el uso de tinciones como el Rojo de Nilo para determinar el contenido total de lípidos y los lípidos neutros por medio de microscopía de EPI fluorescencia (Roopnarain *et al.*, 2015; Moran *et al.*, 2022), el uso de un densitómetro para determinar el porcentaje relativo a cada clase de lípidos o identificar el peso relativo de estos mediante cromatografía analítica en capa fina (TLC) (Fernández *et al.*, 2016).

# METODOLOGÍA

**Objetivo general:** Desarrollar un proceso de transesterificación directa por actividad lipasa endógena de microalgas silvestres de Costa Rica para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos, como materia prima para biocombustibles.

## 1. Determinar el rendimiento y perfil químico de los lípidos en las microalgas silvestres *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris*.

Se estudiaron dos microalgas de tipo silvestre, *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris* procedentes de la colección del laboratorio de microalgas del ITCR y del laboratorio de bio-emprendimiento del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) respectivamente. Estas cepas fueron sometidas a una primera ronda de selección para la identificación de aquella que presentase el mayor potencial de síntesis de lípidos. Los inóculos de *Isochrysis galbana* y de *Chlorella vulgaris* se mantuvieron en Erlenmeyers de 250 mL a 2L con medio F/2 y BG11 a luz continua, respectivamente.



**Figura 1.** Inóculos de *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris* en Erlenmeyer de 250 mL, 1000 mL y 2000 mL con volumen de cultivo de 25 mL, 100 mL y 200 mL respectivamente, en agitación a 120 rpm, para facilitar la aireación y mezcla de nutrientes.

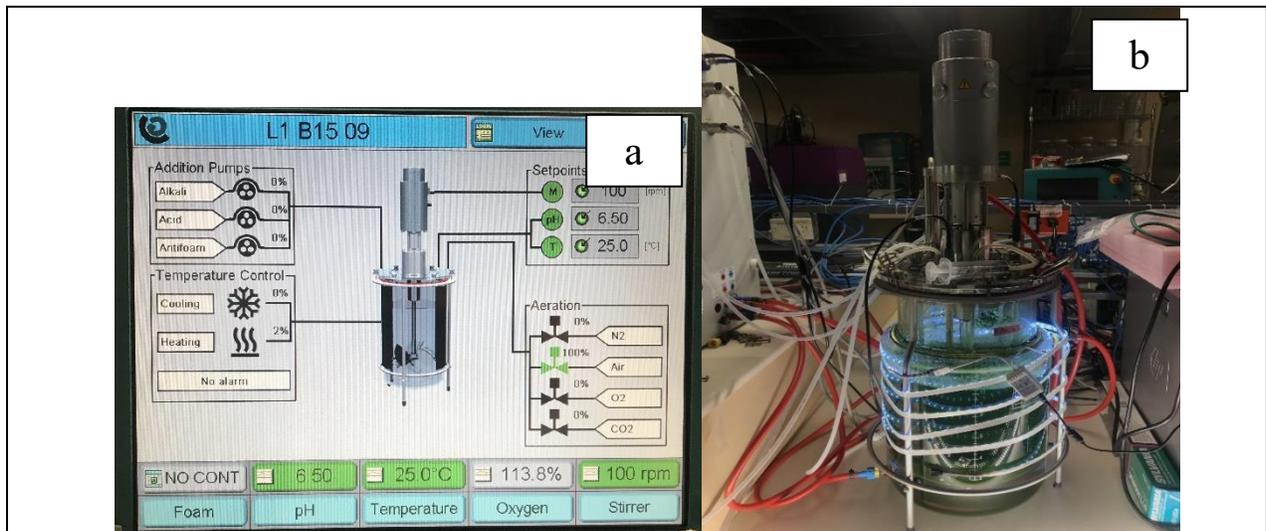
### 1.1.1. Cultivar y cosechar la microalga a nivel de laboratorio.

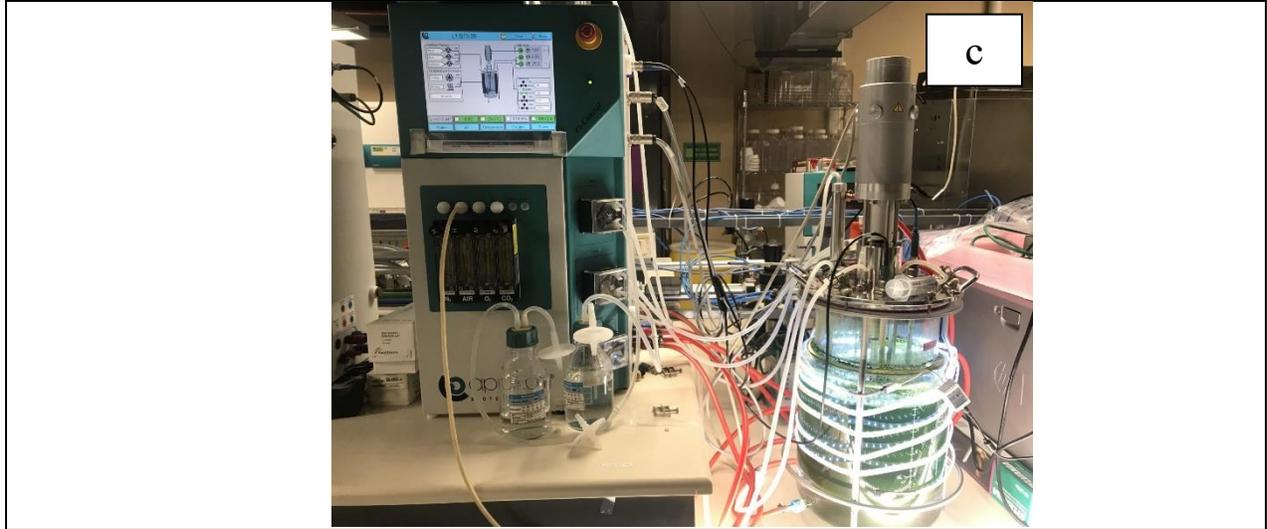
El cultivo de *I. galbana* y *C. vulgaris* se realizó en un biorreactor tipo tanque agitado (Aplikkon Biotechnologies-Z310110011, Holanda) de 15 L al cual se le colocaron luces led de forma de espiral externa. Este se llevó a un sesenta por ciento de su capacidad con agua destilada y se autoclavó con el equipo (Tuttnauer-T-MAX-12 SP-2H, Holanda) a 121 ° C por 30 min sin secado.

Para el crecimiento de *I. galbana* y *C. vulgaris* se prepararon 1.8 L de un medio F/2 suplementado con sales, en una proporción 1:2 y medio BG11 respectivamente. Los biorreactores se inocularon de forma independiente con 1.5 L de inóculo de *I. galbana* y *C. vulgaris* respectivamente, añadidos con una bomba peristáltica (**Figura 2**). El cultivo se mantuvo bajo condiciones controladas de laboratorio 25 ±1°C, pH 6,5 ± 0,5 bajo agitación mediante dos agitadores tipo propela marina a velocidades de 100 rpm (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2.** Condiciones de cultivo de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris*.

Temperatura	pH	Oxígeno disuelto	Velocidad
25 °C	6.5	2 ppm	100 rpm





**Figura 2.** Cultivos de *Isochrysis galbana* adaptados al biorreactor *Applikon Biotechnology* de 15 L con luz a una longitud de onda conocida. Las fotografías ilustran: (a) Pantalla principal del biorreactor L1 B15 09 donde se monitorean los parámetros de control del cultivo como pH, oxígeno disuelto, densidad celular, temperatura. (b) Cultivo *Isochrysis galbana* en fase final. (c) Cultivo de *Isochrysis galbana* en el sistema acoplado completo de equipo de control y fotobiorreactor *Applikon Biotechnology* de 15 L.

**Nota:** Las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris* fueron cultivadas de forma separada, en el mismo tipo de sistema y condiciones.

Las microalgas se cosecharon y recolectaron en galones a las 648 horas de cultivo. La biomasa obtenida se centrifugó en un equipo (Roto Silenta 630RS, Hettich Zentrifugen Alemania) a 3000 RFC con el fin de concentrar la biomasa, este paso se repitió dos veces.



**Figura 3.** Cosecha de la biomasa de *Isochrysis galbana* por centrifugación. Volumen final obtenido del biorreactor *Applikon Biotechnology* de 15 L.

**Nota:** Las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris* fueron cosechadas de forma separada, en el mismo tipo de centrifuga y condiciones.

### **1.2. Cuantificar el rendimiento lipídico de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris*.**

Se determinó la cantidad de los lípidos totales de la biomasa húmeda recuperada mediante el método de Folch (**Figura 4**), por triplicado. Para ello, se agregaron 3 ml de biomasa en viales previamente lavados y pesados y se les agregaron 12,5 mL de una mezcla de cloroformo- metanol 2:1. Las muestras se mantuvieron en agitación a 30 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se trasladaron a recipientes para centrifugación tipo Falcon y se realizó un lavado con agua ultrapura con KCl 0,8 a los viales para recuperar el residuo.

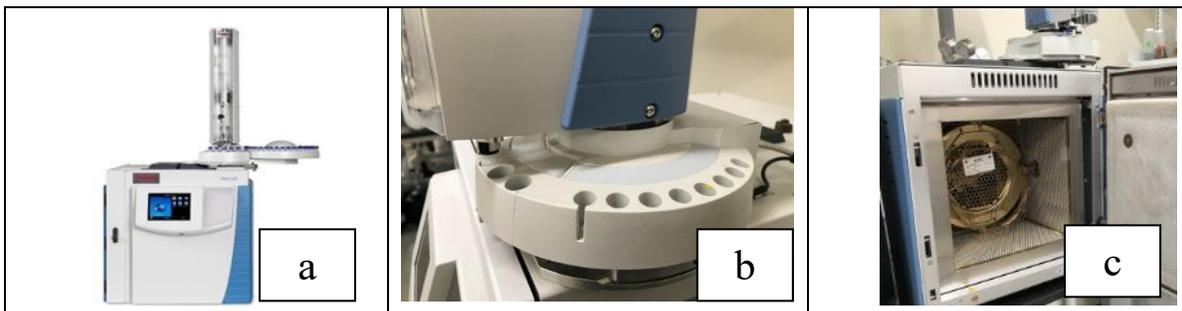
Al contenido de los Falcon se les añadió un volumen de 5 mL de agua ultrapura con KCl, se agitó manualmente y se colocó en centrifuga a 3000 RCF durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se trasvasó la fase orgánica inferior a viales limpios y previamente pesados. Todo esto se realizó por duplicado a fin de que se realizarán al menos dos lavados al contenido de los Falcon. Finalmente, los nuevos viales se dejaron colocados en cámara a fin de que se secura el contenido de estos.



**Figura 4** (a). Ensayo preliminar para la extracción de lípidos totales (Temperatura 30°C, agitación constante a 500 rpm por 24 h) por el método de Folch. (b). Extracciones a partir de biomasa de microalgas en cloroformo/metanol (en proporción 2/1 respectivamente).

### 1.3. Implementar un método de cuantificación esteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.

El Centro Nacional De Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) cuenta con diversos equipos químico-analíticos en su centro de investigación, entre ellos un cromatógrafo de gases, sin embargo, no se cuenta con una metodología para identificar y cuantificar esteres metílicos de ácidos grasos, por lo que se implementó dicha metodología mediante cromatografía de gases (**Figura 5**).



**Figura 5.** (a) Sistema de Cromatografía de Gases Thermo Scientific Trace 1300 (GC-FID). (b) automuestreador y (c) ubicación de la columna de gases y columna de gases en color cobre.

Previo a la identificación y cuantificación de los lípidos presentes en la biomasa microalgal, se realizaron inyecciones de esteres metílicos de ácidos grasos patrón, con una mezcla de concentración conocida para verificar el tiempo de retención de cada analito bajo las condiciones propuestas a continuación en el **cuadro 3**:

**Cuadro 3.** Condiciones cromatográficas empleadas como base para implementar el método de identificación y cuantificación de los lípidos por cromatografía de gases en el CENIBiot.

<b>Parámetro</b>	<b>Condición</b>
<b>Autoinyector</b>	
Volumen de inyección	0.8 $\mu$ L
Lavados con muestra	2 veces
Lavado con disolvente	2 veces
<b>Columna</b>	
SPTM-2560 Supelco 37	100 m x 0.25 m x 0.2 $\mu$ m
Fase estacionaria	Poli (biscianopropilsiloxano)
Temperatura 1	200 $^{\circ}$ C
Tiempo de equilibrio	3 $^{\circ}$ C/min 100-200 $^{\circ}$ C, 3 min 0.50 $^{\circ}$ C/min 200-240 $^{\circ}$ C, 10 min
<b>Detector de FID</b>	
Temperatura	250 $^{\circ}$ C
Velocidad de muestreo	8 ms
<b>SPL1</b>	
Temperatura	225 $^{\circ}$ C
Modo	Split 200
Presión	195,2 kPa
Flujo total	53.8 mL/minuto
Flujo de la columna	0.75 mL/minuto
Velocidad lineal	15.2 cm/s
Flujo de purga	3.0 mL/minuto
Make up	75 kPa
Nitrógeno	65 kPa
Aire	60 kPa

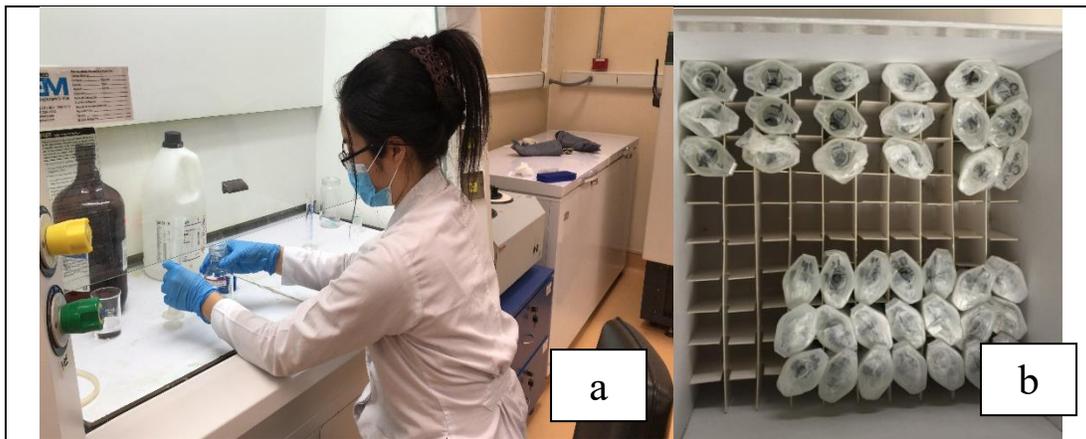
Una vez estandarizado el método, se corrieron las muestras para afinar detalles técnicos y emplear dicho método en la caracterización posterior de los lípidos microalgales.

## 1.4. Implementar un protocolo de extracción y de lípidos en la microalga seleccionada con solventes.

### 1.4.1. Extracción por solventes.

#### Extracción cloroformo / metanol

Para la preparación de muestras, se procedió a hervir 500  $\mu\text{L}$  de biomasa húmeda, seguido por la adición de 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo/metanol. La mezcla fue agitada vigorosamente durante un minuto. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación a 16000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fase inferior resultante fue transferida a un nuevo vial. Seguidamente, se realizó una segunda extracción del pellet utilizando 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo/metanol ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** (a) Estudiante asistente Daniela Lai |realizando extracciones de lípidos de biomasa húmeda de la microalga *Chlorella vulgaris*. (b) Lotes de extractos de lípidos para ser analizados por la metodología de cromatografía de gases.

#### Extracción con hexano de lípidos neutros

Para la preparación de muestras, se procedió a hervir 500  $\mu\text{L}$  de biomasa húmeda, seguido por la adición de 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo/metanol. La mezcla fue agitada vigorosamente durante un minuto. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación a 16000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fase inferior resultante fue transferida a un nuevo vial. Seguidamente, se realizó una segunda extracción del pellet utilizando 500  $\mu\text{L}$  de Hexano.

## **1.5. Caracterizar la fracción lipídica de la de las microalgas *I. galbana* y *Chlorella sp*, mediante cromatografía de gases.**

### *1.5.1. Cromatografía de gases.*

El análisis se realizó en el cromatógrafo de gases con el que cuenta el CENIBiot (**Figura 2**), según las condiciones implementadas en la actividad 1.2. Los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos se inyectaron en el cromatógrafo de gases para su identificación y cuantificación. Los fragmentos se analizaron en su totalidad pico a pico y se consideraron solo aquellos ácidos grasos saturados e insaturados y esterres metílicos de ácidos grasos.

## **2. Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada**

### **2.1. Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada.**

La cepa seleccionada con mayor contenido lipídico fue cultivada bajo condiciones de estrés para la inducción de una mayor producción de lípidos. Este ensayo se realizó en el CENIBiot. La microalga se mantuvo en condiciones de crecimiento estándar y se tomaron como referencia los principales parámetros de cultivo obtenidos de la publicación “Efectos de la longitud de onda de luz, el fotoperiodo y la salinidad en los parámetros de producción de *Isochrysis galbana*” (Ramírez *et al.*, 2023). Para este caso específico se utilizó la combinación de los factores de luz constante de 24 h y salinidad de 28 ppm, los cuales permitieron alcanzar la mayor densidad celular.

La inducción de producción de lípidos (o estrés nutricional) en microalgas se realizó mediante la reducción o limitación de nitrógeno en el medio de cultivo, por lo que se preparó medio de cultivo modificado y reducido en la fuente de nitrógeno, conteniendo 50%, de la concentración original. El cultivo de la microalga se realizó en condiciones de laboratorio descritas en el objetivo 1. Se tomaron muestreos cada 24 horas. La acumulación de lípidos en las microalgas se indujo en condiciones de fotoperiodo (o estrés por fotoperiodo) de 24 h luz blanca constante en el cultivo microalgal. Por su parte, la adaptación metabólica en la microalga *Isochrysis galbana* se indujo a una salinidad de 28 ppm.

**Conteo celular y medición de absorbancia por espectrofotometría.** Durante un periodo de 672 horas, se recolectaron 10 mL de muestra del biorreactor de 15 L en el que se realizó el cultivo de *I. galbana*; a partir del cual se realizó un recuento de células en un hemocitómetro Thoma (0,100 mm de profundidad y 0,0025 mm<sup>2</sup>) bajo un microscopio óptico de luz (Motic -BA310, China). Además, se midió la absorbancia de la muestra por triplicado a 680 nm en un espectrofotómetro (Perkin- Lambda 35 UV/VIS, USA).

**Peso seco.** Para cuantificar el peso seco se dispensaron 2 mL de biomasa húmeda en tres cápsulas de porcelana previamente pesados. Las muestras se colocaron en un horno estufa (Isotemp 750 Programmable Draft Furnace, Fisher Scientific, USA) a 103°C durante 24 horas. Cumplido este periodo se dejaron en un desecador para que los recipientes se enfriaran y las muestras no recuperarán humedad. Se pesaron las cápsulas utilizando una balanza analítica (Mettler toledo- AB204S, Suiza) y se determinó el peso seco por diferencia.

### **3. Determinar la actividad lipasa endógena en la cepa seleccionada de microalga**

#### **3.1. Evaluar la actividad lipasa endógena de la cepa con mayor rendimiento lipídico.**

La biomasa de las microalgas se cosechó por centrifugación y a continuación se llevó a cabo un ensayo de inactivación de enzimas por un proceso de escaldado a 100 °C por 5 min por convección en baño maría. El propósito de este paso fue inhibir la acción enzimática endógena en las muestras para la posterior extracción de la fracción lipídica en diferentes tiempos posteriores a la cosecha.

#### **3.2. Generar un perfil químico por cromatografía de gases de los lípidos de la microalga seleccionada bajo los mejores parámetros de producción de lípidos y mayor actividad lipasa endógena.**

El análisis se realizó en el cromatógrafo de gases con que cuenta el CENIBiot, según las condiciones implementadas en la actividad 1.2. Los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos se inyectaron en el cromatógrafo de gases para su identificación y cuantificación. Los fragmentos se analizaron en su totalidad pico a pico y se consideraron solo aquellos ácidos grasos saturados e insaturados y esterres metílicos de ácidos grasos.

#### **3.3. Confirmación del perfil químico de los lípidos por cromatografía en espectrometría de masas de alta resolución.**

El análisis se realizó en el espectrómetro de masas de alta resolución (Orbitrap) del Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), según las condiciones implementadas en la actividad 1.2. Los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos se inyectaron en el cromatógrafo de gases para su identificación y cuantificación. Los fragmentos se analizaron en su totalidad pico a pico y se consideraron solo aquellos ácidos grasos saturados e insaturados y ésteres metílicos de ácidos grasos.

#### **4. Establecer el protocolo para la producción de FAME *in situ* a partir de microalgas por la actividad de lipasa endógena**

La correlación obtenida entre la composición lipídica, la actividad lipasa de la cepa seleccionada y de las condiciones de cultivo, orientó la estrategia hacia las condiciones de proceso de transesterificación *in situ* de la cepa seleccionada, lo que permitió identificar la producción de FAMEs obtenida (precursor para la futura generación de biocombustibles).

##### **4.1. Desarrollar el experimento de transesterificación *in situ*.**

###### *4.1.1. Transesterificación de los lípidos in situ.*

Para seleccionar las mejores condiciones de los procesos enzimáticos endógenos *in situ* se emplearon los métodos de ruptura celular descritos en el punto 1.4. El disolvente empleado fue metanol grado analítico (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Condiciones de reacción a estudiados en el proceso de producción de FAME *in situ* por actividad lipasa endógena en biomasa microalgal.

<b>Condición</b>	<b>Valor</b>
Temperatura (°C)	30
pH	6.5
Concentración de alcohol (mol lípido: mol alcohol)	1:3

Cada reacción fue establecida por triplicado y se realizaron muestreos continuos para determinar la cinética de producción de FAMES. Cada muestra fue congelada a -80 °C para la posterior extracción de la fracción orgánica e identificación de FAME, según la metodología desarrollada en el punto 1.5.

#### **4.2. Identificación de los FAMES producidos de la cepa seleccionada.**

Según las metodologías de extracción de lípidos desarrolladas en el punto 1.3, los FAME producidos mediante transesterificación *in situ* fueron extraídos y se identificaron los diferentes ácidos grasos esterificados producidos por esta metodología.

### **5. Determinar la calidad del precursor de biocombustible producido versus la calidad de muestras comerciales.**

Por la naturaleza del precursor de biocombustible a partir de biomasa microalgal y por la cantidad insuficiente obtenida de este para realizar los ensayos de cuantificación y comparación con un biodiesel comercial, se modificó el procedimiento para la determinación de la calidad del precursor de biocombustible producido versus la calidad de biodiesel comercial; evaluándose la calidad únicamente del precursor de biocombustible producido de la biomasa de *I. galbana* mediante un análisis termogravimétrico.

#### **5.1. Análisis termogravimétrico (TGA).**

El análisis se realizó en un analizador termogravimétrico. El analizador termogravimétrico mide continuamente la masa mientras la temperatura de la muestra cambia con el tiempo. La masa, la temperatura y el tiempo en el análisis termogravimétrico son las mediciones de base. El analizador termogravimétrico utilizado consiste en una balanza de precisión con una bandeja donde es colocada la muestra, la cual es ubicada dentro de un horno a una temperatura de control programable. La temperatura aumenta a una velocidad constante para incurrir en una reacción térmica. Los datos termogravimétricos recolectados de la reacción térmica se compilaron en un gráfico de porcentaje de masa inicial en función de la temperatura o el tiempo. El resultado de TGA se utilizó para la caracterización del precursor del biocombustible a partir de biomasa microalgas a través del análisis de patrones de descomposición característicos.

## RESULTADOS

### 1. Determinar el rendimiento y perfil químico de los lípidos en las microalgas silvestres *I. galbana* y *Chlorella sp.*

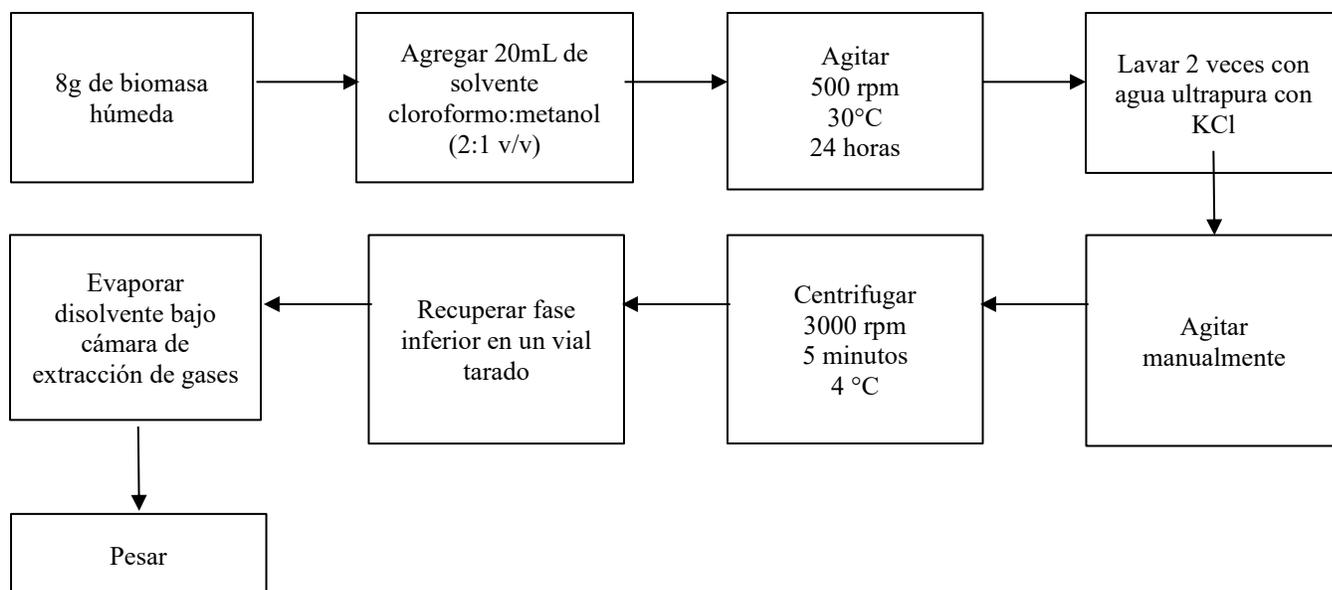
#### 1.1. Cuantificar el rendimiento lipídico de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris*.

Realizada la cosecha del cultivo se procedió a concentrar la biomasa por centrifugación. A partir de la biomasa de cada una de las microalgas se procedió a determinar por medio del método de Folch modificado (1957) la cantidad de lípidos totales (mg. gDW-1) presentes en estas biomásas. En el cuadro 5, se observan los datos obtenidos de muestras analizadas por triplicado y los parámetros utilizados en el método de concentración de la biomasa.

**Cuadro 5.** Cuantificación del rendimiento lipídico de la biomasa de las microalgas *I. galbana* y *C. vulgaris*.

Nombre de la microalga silvestres	<i>C.vulgaris</i>	<i>I.galbana</i>
Concentración de la biomasa al final del cultivo (gDW.L <sup>-1</sup> )	0,98	0,60
Lípidos (mg. gDW-1)	5,75	6.61
Método de concentración	Centrifugación 5000 rcf * 20 min	
Concentración de la biomasa después de concentración (gDW.L-1)	50	68

La cuantificación de los lípidos totales de la biomasa de microalgas se llevó a cabo utilizando un protocolo modificado del método de Folch (1957). La extracción de lípidos se realizó con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) que contiene 0,1 mg/mL de hidroxitolueno butilado (BHT) para evitar que se oxiden los lípidos (**Figura 7**).



**Figura 7.** Protocolo de extracción de lípidos totales de biomasa húmeda de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris* basado en el método de Folch modificado (1957).

**1.2.** Implementar un método de identificación esteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.

Paralelamente a la determinación del rendimiento lipídico de las microalgas en estudio, se investigó y diseño un método de identificación esteres metílicos de ácidos grasos, con el fin de ser ensayado en el cromatógrafo de gases Trace 1300 Thermo Scientific del CENIBiot. En el cuadro 6, se observan los parámetros y la condición de cada uno de estos a ser utilizados en la identificación y cuantificación esteres metílicos de ácidos grasos.

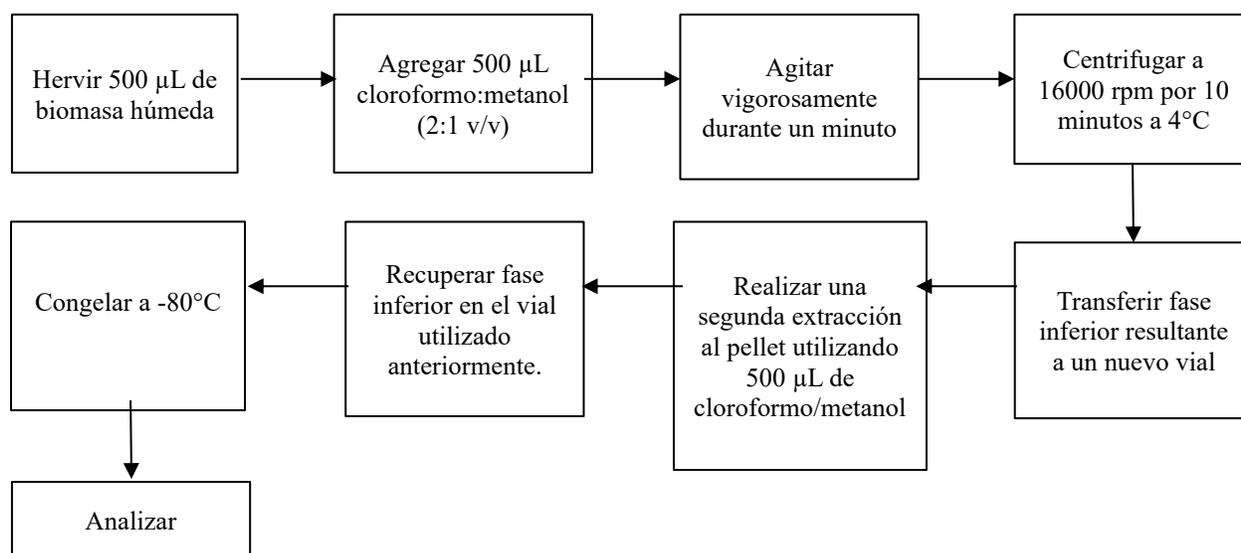
**Cuadro 6.** Método de identificación y cuantificación de esteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.

Parámetro	Condición
<b>Autoinyector</b>	
Volumen de inyección	0.8 $\mu$ L
Lavados con muestra	2 veces
Lavado con disolvente	2 veces
<b>Columna</b>	
SPTM-2560 Supelco 37	100 m x 0.25 m x 0.2 $\mu$ m
Fase estacionaria	Poli (biscianopropilsiloxano)
Temperatura 1	200 °C

Tiempo de equilibrio	3 °C/min 100-200 °C, 3 min 0.50 °C/min 200-240 °C, 10 min
<b>Detector de FID</b>	
Temperatura	250 °C
Velocidad de muestreo	8 ms
<b>SPL1</b>	
Temperatura	225 °C
Modo	Split 200
Presión	195,2 kPa
Flujo total	53.8 mL/minuto
Flujo de la columna	0.75 mL/minuto
Velocidad lineal	15.2 cm/s
Flujo de purga	3.0 mL/minuto
Make up	75 kPa
Nitrógeno	65 kPa
Aire	60 Pa

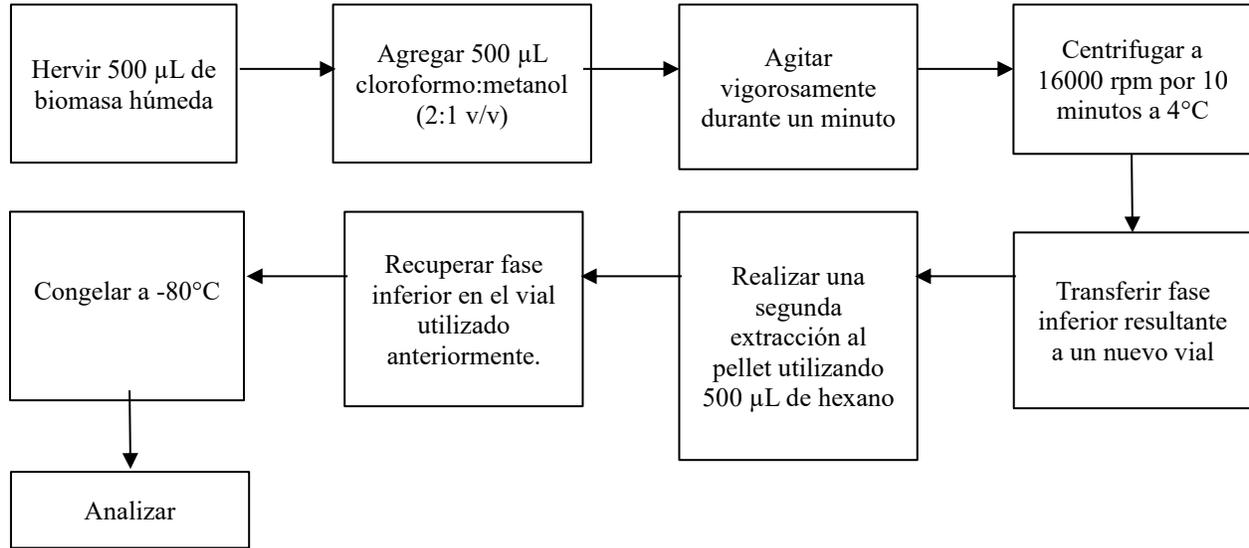
### 1.3. Implementar un protocolo de extracción de lípidos en la microalga seleccionada con solventes.

Los protocolos de extracción utilizados en la microalga seleccionada *Isochrysis galbana* fueron; una extracción con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para lípidos totales y una extracción con hexano para lípidos neutros. En la siguiente figura se observa el proceso de extracción con cloroformo/metanol (2:1 v/v) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Protocolo de extracción de lípidos totales de la biomasa húmeda de la microalga *Isochrysis galbana* con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para extracción de lípidos totales.

En la siguiente figura se observa el proceso de extracción con hexano (**Figura 9**).



**Figura 9.** Protocolo de extracción de lípidos totales de la biomasa húmeda de la microalga *Isochrysis galbana* con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para extracción de lípidos neutros.

**1.4.** Caracterizar la fracción lipídica de las microalgas *I. galbana* y *Chlorella vulgaris*, mediante cromatografía de gases.

Al realizarse la caracterización de la fracción lipídica de las microalgas *I. galbana* y *C. vulgaris*, se evidenció la presencia de ácidos grasos de 18 carbonos en la biomasa de estas microalgas, específicamente se observaron el ácido oleico, el ácido linoleico, el ácido linoeláidico y el ácido gamma Linolénico (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Caracterización de la fracción lipídica de las microalgas *I. galbana* y *C. vulgaris*.

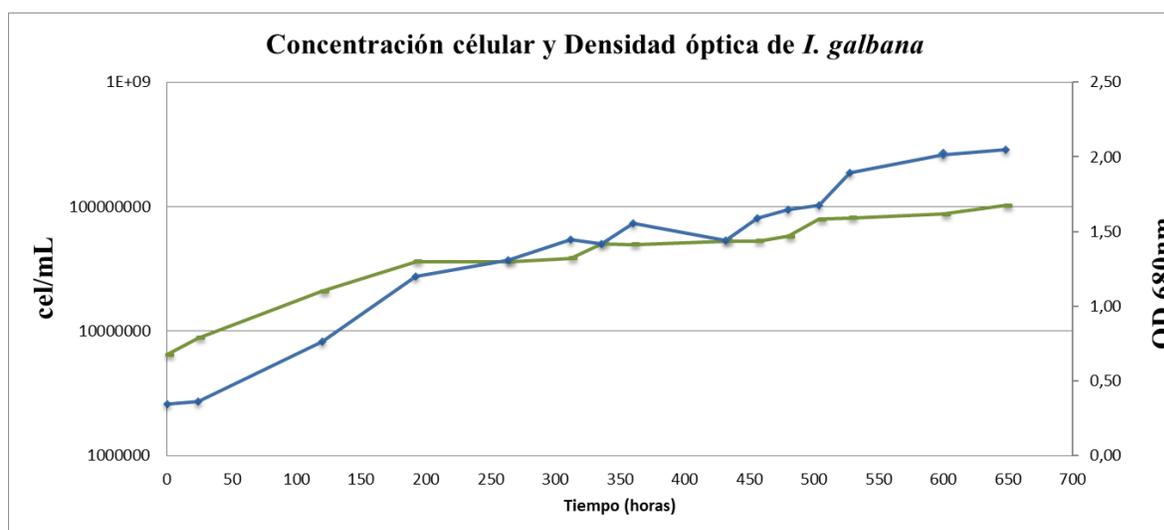
	<b>Ácidos grasos de 18 carbonos</b>			
<b>Nombre común</b>	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linoeláidico (Trans)	Ácido gamma Linolénico
<b>Símbolo</b>	18:1 Δ9	18:2 Δ9,12	18:2 Δ9E,12E	18:3 Δ6,9,12
<b><i>Chlorella Vulgaris</i></b>	Ausente	Presente	Presente	Presente

<i>Isochrysis Galbana</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
---------------------------	----------	----------	----------	----------

## 2. Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada

### 2.1. Inducir el aumento productivo de lípidos en la cepa seleccionada

En la figura 10 se observa el crecimiento celular del cultivo de *I. galbana* en un biorreactor cerrado de 15 L en medio de cultivo F/2 en condición de reducción de fuente de nitrógeno, a 28 ppm de salinidad y luz constante. La biomasa fue cultivada en forma autotrófica y la concentración celular máxima alcanzada fue de  $1,0 \times 10^8$  cél/mL y la densidad óptica máxima fue de 2,1 a 680 nm por un periodo de 27 días.



**Figura 10.** Concentración celular y densidad óptica a 680 nm del cultivo de *I. galbana* en un biorreactor 15 L a  $25 \pm 1$  °C. iluminación constante, pH  $6,5 \pm 0,5$ , en medio F/2 durante 27 días (648 h).

## 3. Determinar la actividad lipasa endógena en la cepa seleccionada de microalga

### 3.1. Evaluar la actividad lipasa endógena de la cepa con mayor rendimiento lipídico.

La biomasa de la microalga *I. galbana* fue la que presentó mayor rendimiento lipídico, por tanto, se determinó la actividad lipasa endógena en esta biomasa. Para su determinación los tres valores más importantes a tomar en cuenta son el pH, la concentración de etanol y la temperatura; los valores optimizados se presentan en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Parámetros optimizados para la determinación de la actividad lipasa endógena en la biomasa de la microalga *I. galbana*.

<b>Buffer for reaction</b>	200 mM Phosphate buffer (pH 6.5)
<b>Ethanol (M) in the reaction medium</b>	2
<b>Temperature (°C) for reaction</b>	30

**3.2. Generar un perfil químico por cromatografía de gases de los lípidos de la microalga seleccionada bajo los mejores parámetros de producción de lípidos y mayor actividad lipasa endógena.**

**Cuadro 9.** Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) determinados mediante análisis por cromatografía de gases de una transesterificación *in situ* por medio de catálisis enzimática de *I. galbana*.

<b>Éster metílico de ácidos grasos</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Tiempo de retención GC (min)</b>	<b>Tiempo de retención estándar (min)</b>
Octanoato de metilo (C8:0)	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	16.81	16.41
Decanoato de metilo (C10:0)	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	21.49	21.13
Miristato de metilo (C14:0)	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	31.01	31.39
Miristoleato de metilo (C14:1)	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	33.31	33.38
Palmitato de metilo (C16:0)	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	35.09	36.10
Palmitoleato de metilo (C16:1)	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	37.04	37.70
Estearato de metilo (C18:0)	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	40.85	40.70
Linoleato de metilo (C18:2)	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	44.20	44.39
Metil cis-5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoato (C20:5)	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O	52.91	53.70
Metil cis-4, 7, 10, 13, 16, 19- docosahexaenoato (C22:6)	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O	61.94	59.29



4. Establecer el protocolo para la producción de FAME *in situ* a partir de microalga seleccionada por la actividad de lipasa endógena.

#### 4.1. Desarrollar el experimento de transesterificación *in situ*

**Cuadro 10.** Resumen de las condiciones, métodos y técnica utilizadas para la realización de la transesterificación *in situ* con las enzimas lipasas endógenas de *I.galbana*.

Nombre de la cepa	<i>I.galbana</i>
Biomass concentration at the end of cultivation (gDW.L <sup>-1</sup> )	0,60
Lípidos (mg.gDW <sup>-1</sup> )	6,16
Método de concentración	Centrifugación 3000 xg
Concentración de biomasa después de la concentración (gDW.L <sup>-1</sup> )	68,0
Concentración de biomasa en el medio de reacción (g.L <sup>-1</sup> )	25
Volumen de reacción (mL)	11
Tampón para la reacción	200 mM Tampon fosfato (pH 6.5)
Etanol (M) en el medio de reacción.	2
Temperatura (°C) para la reacción	30
Disolventes para extracción de lípidos (volumen extraído/volumen de disolvente)	500 µL extracto / 500 µL CHCl <sub>3</sub> /MeOH - 500 µL Hexano
Técnica analítica	GC-FID*

#### 4.2. Caracterizar la producción de FAMES de la cepa seleccionada

**Cuadro 11.** Ésteres metílicos de ácidos grasos identificados por cromatografía de gases como producto de la transesterificación *in situ* con las enzimas lipasas endógenas de *I.galbana*.

<b>Éster metílico de ácidos grasos</b>
Octanoato de metilo (C8:0)
Decanoato de metilo (C10:0)
Miristato de metilo (C14:0)
Miristoleato de metilo (C14:1)
Palmitato de etilo (C16:0)
Palmitoleato de metilo (C16:1)
Estearato de metilo (C18:0)
Linoleato de metilo (C18:2)

Metil cis-5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoato (C20:5)
Metil cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoato (C22:6)

5. Determinar la calidad del precursor de biocombustible producido versus la calidad de muestras comerciales

5.1. Análisis termogravimétrico

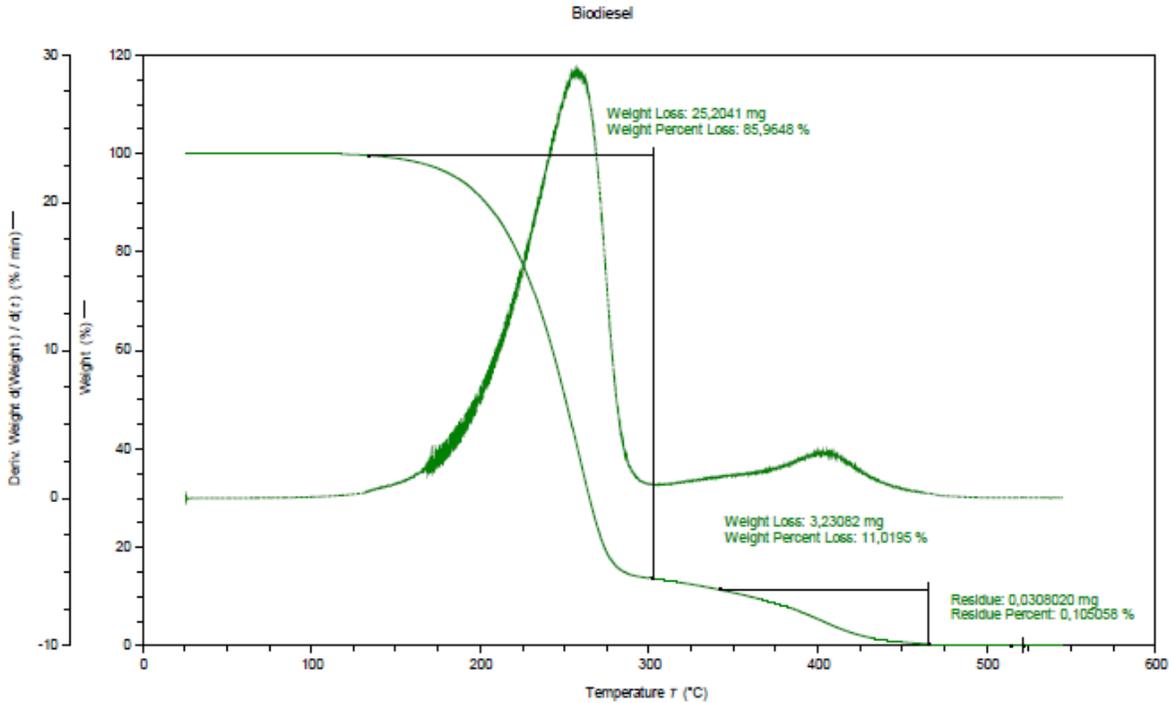
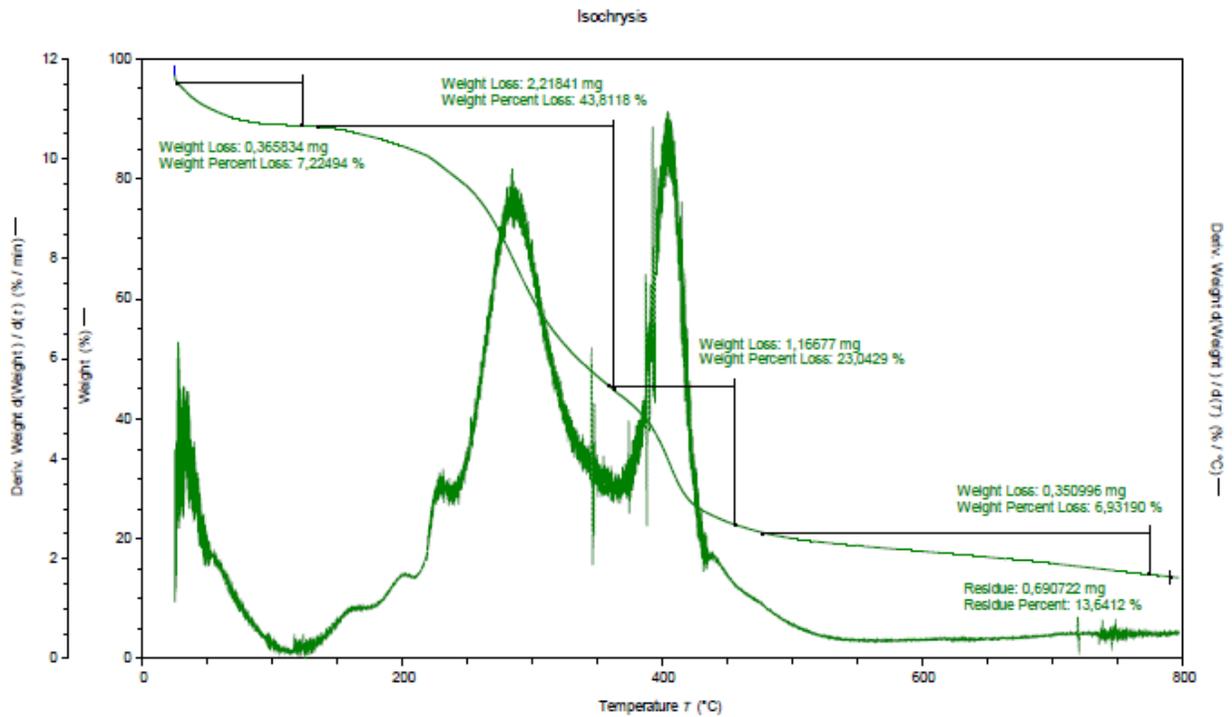


Figura 13. Termograma de la muestra de Biodiesel .



**Figura 12.** Termograma de la muestra del precursor de biocombustible de *Isochrysis galvana* .

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Autores como Sukarni *et al* (2018) y Nalder *et al.* (2015), reportaron resultados de  $1,0 \times 10^7$  y  $1,9 \times 10^7$  respectivamente cuando cultivaron *Isochrysis* en medio F/2; cabe señalar que los autores realizaron los cultivos por períodos de 8 y 17 días respectivamente. Además, los inóculos utilizados en ambos estudios presentaban concentraciones de  $3,0 \times 10^6$  y  $4,2 \times 10^6$  cel/mL respectivamente; las cuales fueron menores a la que se utilizó en este estudio  $6,5 \times 10^6$  cel/mL. Posiblemente por el tipo de biorreactor cerrado y las condiciones de cultivo establecidas, es que se obtuvo una concentración celular mayor por un periodo más largo de tiempo.

Otro estudio reportó densidades máximas de  $1,2 \times 10^7$  cél/mL al cultivar *Isochrysis sp.* en medio estándar Walne en condiciones de  $25 \pm 1$  °C. iluminación constante (aproximadamente 1540 lux equivalentes a  $30,7 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ ), pH  $6,5 \pm 0,5$  similares a la establecidas en esta investigación (Tan *et al.*, 2021). Comparativamente con el resultado obtenido ( $1,0 \times 10^8$  cél/mL), la concentración es mayor bajo las mismas condiciones; sin embargo, la diferencia por esta misma condición puede atribuirse a la composición de los medios de cultivo. Dentro del medio Walne se incluye una serie de elementos que sirven como fuentes de

elementos como molibdeno, boro y cobre, pero no cuenta con la diversidad de vitaminas que posee el medio F/2 biotina, tiamina y B12 (González *et al.*, 2023).

Ha sido documentado que la producción de la biomasa y la acumulación de lípidos son procesos antagónicos, pues estos requieren de altas concentraciones de nitrógeno y de una deficiencia del mismo respectivamente. Luna (2023) ha reportado que al cultivar microalgas autotróficas en medio F/2 se provoca un agotamiento del nitrógeno y por ende una fase de crecimiento lento. Esto se debe a que la única fuente de nitrógeno en el medio F/2 son los nitratos; y se ha observado que las microalgas asimilan dicha forma de nitrógeno de forma lenta y continua.

Por otra parte, con respecto a la absorbancia, se obtuvo una máxima de 2,1 a 680 nm a los 27 días, asociada a una densidad celular de  $1,0 \times 10^8$  cel/mL (Fig.1). Estudios han reportado absorbancias de 2,8 al alcanzar densidades de  $1,7 \times 10^7$  cel/mL (Hotos *et al.*, 2023) y de 2,0 al alcanzar una densidad de  $1,9 \times 10^7$  cél/ mL cuando se realiza la cosecha del cultivo (Gnouma *et al.*, 2017). Esto significa que en este estudio se obtuvo una absorbancia similar a las mencionadas por Hotos *et al.* (2023) y Gnouma *et al.* (2017) que se relaciona con la concentración celular obtenida al cosechar la biomasa de *I. galbana* para esta investigación.

Realizada la cosecha del cultivo se procedió a concentrar la biomasa por centrifugación (5000 rcf). A partir de esta biomasa se procedió a determinar por medio de la prueba de peso seco la productividad de la biomasa concentrada. En el cuadro 1, se observan los datos obtenidos por triplicado para este análisis.

Se analizó la productividad de la biomasa de *I. galbana* mediante peso seco. Se obtuvo un valor promedio de 0,14 g correspondiente a una productividad de 0,68 g/L. Este valor se asemeja a otros reportados igualmente en cultivos autotróficos de *I. galbana*; Picardo *et al.* (2013) y Zheng *et al.* (2022) determinaron productividades aproximadas de 0,52 g/L, dato reportado para condiciones y medio de cultivo similares a las utilizadas en este estudio.

La biomasa está directamente afectada por las condiciones ambientales y nutricionales a las que se somete el cultivo microalgal. Alkhamis y Qin (2013) obtuvieron 0,11 g/L al realizar un cultivo fototrófico por 10 días, un valor seis veces menor al obtenido en este estudio, comparativamente si este cultivo se extendiera a 30 días podría haber triplicado su concentración, sin embargo, aun así, estaría por debajo de la concentración en g/L obtenida en este estudio que es aproximadamente el doble (0,68 g/L.) en 27 días.

Con respecto a la influencia de la luz, algunos estudios en microalgas han observado que la densidad celular incrementa y que la fuente lumínica impacta en esto. Chowdury *et al.* (2020) compararon la densidad de un

cultivo al utilizar luces led semejantes a las utilizadas en este estudio, contra luces fluorescentes. Determinaron al final de la etapa exponencial una densidad de  $6,7 \times 10^7$  y  $7,9 \times 10^7$  cel/mL al utilizar luces LED blancas y fluorescentes respectivamente. A pesar de la diferencia significativa en los resultados de dicho estudio, los LED presentan ciertas ventajas como su tamaño más pequeño que permite una mayor disipación del calor, una vida útil más larga y una longitud de onda más estrecha (Kwan *et al.*, 2020).

A través del resultado obtenido también es posible comparar los diferentes sistemas de cultivo y su rendimiento. Se ha visto que al cultivar *I. galbana* en sistemas abiertos como el de canales, la productividad de la biomasa ronda los 0,06 g/L por día (Kusmayadi *et al.*, 2020). Bajo el periodo de cultivo llevado a cabo en este estudio, el valor de productividad sería aproximadamente de 1,32 g/L. Sin embargo, la construcción de los canales implica la necesidad de extensión de terreno y de materiales como cemento y plástico, además de problemas importantes de sedimentación y contaminación, los cuales son solventados en sistemas cerrados pese a su costo (Kusmayadi *et al.*, 2020).

### **Extracción de lípidos totales por método de Folch y reacciones de transesterificación química y enzimática**

La biomasa de *I. galbana* se caracteriza por un alto contenido en lípidos (20-30% en peso seco), lo que hace de esta especie un candidato prometedor para la producción de biocombustibles a escala industrial (Zarrinmehr *et al.*, 2019). Se extrajo el contenido lipídico de la biomasa de *I. galbana* por medio de la técnica de Folch. La eficacia de este método depende de la existencia de sales minerales en el extracto crudo y requiere el uso de grandes volúmenes de disolvente (Ali *et al.*, 2021). En este estudio se obtuvieron 6,16 mg\*gDW<sup>-1</sup> de lípidos totales, lo que representaría aproximadamente menos del 1% de lípidos totales en esta biomasa, lo que es significativamente inferior a los reportado por otros autores. Sin embargo, esto lleva a plantear el reto de estudiar condiciones de cultivo que permitan mejorar la acumulación de lípidos, y a partir de ello desarrollar una nueva estrategia de cultivo.

La productividad de lípidos está más influenciada por el rendimiento de lípidos que por la productividad de biomasa (Roopnarain *et al.*, 2015). Las mayores productividades de lípidos se obtuvieron durante la fase estacionaria temprana y disminuyeron hacia la fase estacionaria tardía, cuando los lípidos dejaron de acumularse (Roopnarain *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2020).

Para la variante T-Iso de *I. galbana* se ha reportado que el contenido de ácidos grasos de mayor a menor corresponde a poliinsaturados, saturados y monoinsaturados. Algunos estudios han hecho hincapié en el primer grupo, reportando contenidos entre el 22-36% (Cao *et al.*, 2019; Zarrinmehr *et al.*, 2019; Putra *et al.*, 2022). Sin embargo, otros autores reportan contenidos ínfimos de este grupo, inclusive del 2% (Putra *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023).

Para la preparación de las muestras de la biomasa concentrada de *I. galbana* para las reacciones de transesterificación química y enzimática. Se utilizó buffer fosfato a un pH de 6.5 a una concentración de 200 mM, a 2 M de etanol y a una temperatura de 30 °C. Se tomaron 500 µL del extracto, a los cuales se les realizó una extracción cloroformo- metanol 2:1, posteriormente las muestras fueron secadas al vacío, se resuspendieron en hexano. Se les agregó MSTFA, pirimidina y se les realizó la derivatización, para analizarlas posteriormente en el GC-FID. Se realizaron reacciones enzimáticas por periodos de 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h; con el fin de observar el comportamiento de los picos con respecto al tiempo. Por su parte la transesterificación química, lo que busca es que se dé un consumo total de los lípidos que en teoría equivalen al 100% de los lípidos presentes en la muestra de biomasa de *I. galbana*.

### **Caracterización de la fracción lipídica de *Isochrysis galbana* por cromatografía de gases.**

Como se describió anteriormente mediante un proceso de transesterificación los ácidos grasos pueden ser convertidos en FAMES o FAEEs para ser aprovechados como biodiesel, pero también para su análisis y caracterización (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2020). En el caso de este estudio se realizó una transesterificación *in situ* en biomasa húmeda, lo que implica la extracción directa de los lípidos sin llevar a cabo una desecación previa de la biomasa. Este proceso representa una ventaja a nivel de costos ya que se reduce el gasto energético y el tiempo requerido (Ali *et al.*, 2021). A nivel industrial esto puede resultar muy atractivo ya que el factor energético es de los mayores detractores en la producción de biocombustibles a partir de microalgas (Chaos-Hernández *et al.*, 2023).

En el cuadro 9 se observa una aproximación a un posible perfil de FAMES generado por medio de cromatografía de gases con detección por ionización de llama (CG-FID). Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) determinados mediante análisis por cromatografía de gases de una transesterificación *in situ* por medio de catálisis enzimática de *I. galbana*.

En la figura 11 se observa el cromatograma de la reacción de la transesterificación enzimática a los 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h realizada a la biomasa húmeda de *Isochrysis galbana* pH 6,5, luz constantes. La información presentada en el cuadro 9 fue obtenida a partir de los cromatogramas ejemplificados en la figura 11, donde se muestran los tiempos de retención en los que se representan los picos. Cabe señalar que este análisis, se realiza como un aproximado de los posibles compuestos identificados. Se habla de un aproximado por diversas limitaciones acontecidas en la generación y análisis de los cromatogramas. En primer lugar, se utilizó un kit de 37 FAMES, pero en los cromatogramas obtenidos por GC-FID sólo se observaron 31 picos; por tanto, no se puede determinar qué compuestos específicos no se lograron visualizar. Esto implicó que en la identificación de los posibles analitos se usara como base el hecho de que los compuestos eluyen en orden ascendente de punto de ebullición, lo que proporciona una idea general de la composición de la muestra. Es por esto por lo que para confirmar la identidad de los

FAME observados, es necesario un análisis más detallado en el que se apliquen técnicas como GC-MS/LC-MS o utilizando patrones individuales de los FAMEs en GC-FID. Figura 11. Cromatograma de la reacción de la transesterificación enzimática a los 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h. El fin de realizar los muestreos y cromatogramas a diferentes horas, fue para observar si conforme avanzaba el tiempo se daba un cambio en el perfil de los ésteres metílicos; sin embargo, como se mencionó en la metodología, por la naturaleza del precursor de biocombustible a partir de biomasa microalgal y por la cantidad insuficiente obtenida de este no fue posible realizar los ensayos de cuantificación. Sin embargo, por medio del análisis de los posibles FAMEs generado por catálisis enzimática de las lipasas endógenas de *I. galbana*, se realiza una aproximación de la posible presencia de los siguientes compuestos: octanoato de metilo (C8:0), decanoato de metilo (C10:0), miristato de metilo (C14:0), miristoleato de metilo (C14:1), palmitato de etilo (C16:0), palmitoleato de metilo (C16:1), estearato de metilo (C18:0), linoleato de metilo (C18:2), metil cis-5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoato (C20:5) y metil cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoato (C22:6). A partir de esta aproximación se presume que en las muestras de biomasa analizadas se encontrarán ácidos grasos como ácido caproico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA).

Al evaluar este perfil es posible observar que la mayor parte de los presuntos ácidos grasos encontrados corresponden a saturados. Siendo únicamente el ácido palmitoleico (C16:1) y el miristoleico (C14:1) monoinsaturados; y los ácidos linolénico (C18:2), eicosapentaenoico (C20:5) y docosahexaenoico (C22:6) poliinsaturados.

Algunos estudios han observado un perfil similar al aparentemente observado donde la fracción de posibles ácidos grasos es mayoritariamente saturada. Se ha reportado que al utilizar etanol/n-hexano como parte de la transesterificación la presencia de ácido 9-octadecenoico, el ácido hexadecanoico, el ácido tetradecanoico, y el ácido octadecanoico, pero solo se encontraron unos pocos ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido 9,12,15-octadecatrienoico, el ácido 9,12-octadecadienoico y el ácido docosahexaenoico (Yu *et al.*, 2010). Otro perfil estudiado es el de la cepa *T-Iso* de *I. galbana* en el cual se encontró la presencia de múltiples ácidos grasos: C14:0, C16:0, C16:1, C18:1, C18:2, C18:4 y C22:6, sin embargo, tan solo el ácido mirístico (C14:0) y el palmítico, dos de los ácidos saturados supuestos en este estudio, están presentes en abundancia (Nalder *et al.*, 2015; Gnouma *et al.*, 2017)

La naturaleza del catalizador de la reacción es un factor a tener en cuenta pues es determinante en la composición de la mezcla de FAMEs o FAEEs. Un ácido graso exclusivo para la catálisis alcalina es el ácido linolénico (C18:3), para la ácida, el ácido mirístico (C14:0) y el ácido miristoleico (C14:1) (Medina *et al.*, 2019). En este estudio son las lipasas endógenas de *Isochrysis* las responsables de facilitar el proceso de transesterificación y a partir de lo presuntamente observado permite la obtención de ambas moléculas.

El ácido linoleico es especialmente importante en la producción de biocombustibles. Se ha descrito que una alta concentración de ácido linoleico, oleico y esteárico favorecen el proceso de oxidación del biodiesel y de otros biocombustibles (Campuzano-Duque y Cardeño-López., 2020).

Por otro lado, se ha reportado que en el uso de catalizadores químicos tanto ácidos como básicos, los ácidos grasos más abundantes son el ácido palmítico (C16: 0), el palmitoleico (C16: 1), el oleico (C18: 1) y el linolénico (C18: 3). (Medina et al., 2019). Esto se asemeja a la aproximación de los compuestos generados en los cromatogramas donde las mayores señales corresponden a sus formas esterificadas palmitato de metilo (C16:0) y palmitoleato de metilo (C16:1), seguidas por el DHA y el EPA. Sin embargo, el presunto ácido linoleico no se observó de manera tan abundante y del oleico no se pudo observar su posible presencia. Esto podría deberse a la ausencia del analito dentro del estándar de FAMES Supelco 37 que se utilizó para llevar a cabo el análisis.

Aunque el DHA y el EPA no son foco de interés en esta investigación, *Isochrysis galbana* ha sido descrita en múltiples ocasiones como una microalga rica ácidos grasos poliinsaturados (Gnanakani *et al.*, 2023). Diferentes autores mencionan que la fracción lipídica de *I. galbana* contiene cantidades sustanciales de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga, en particular EPA y DHA, que se consideran compuestos beneficiosos para la salud. (Balduyck *et al.*, 2019). Bousquet et al. (1994) determinaron la composición del grupo de ácidos grasos de *I. galbana* como 28% ácidos grasos saturados, 23 % mono insaturados y 49% poliinsaturados. Hubert *et al.* (2019) observaron un perfil de 8 ácidos grasos destacando que un ácido poliinsaturado como el ácido docosahexaenoico (C22:6-DHA) representan el 13,5% de los ácidos grasos totales en *I. galbana* (Hubert *et al.*, 2019).

El perfil de ácidos grasos de las microalgas *I. galbana* puede variar mucho en función de las condiciones de cultivo y de la fase de crecimiento en el momento de la recolección de la biomasa (Bonfati *et al.*, 2018). Variables como el pH, la temperatura y el catalizador de la reacción han sido descritos como factores determinantes en el perfil lipídico de las microalgas. Se ha reportado que en condiciones de pH neutras o ligeramente alcalinas se presenta mayor productividad de lípidos neutros; sin embargo, esto no fue posible confirmarlo en el presente estudio. Alkhamis *et al.* (2022) reportaron que bajo un pH 10 las productividades de lípidos totales y neutros eran respectivamente 14,4% y 5,2%, pH 6 13,8% y 4,6%; mientras que en pH 8 los valores prácticamente se duplicaron para ambos aspectos (26,9% y 9,3%).

La composición de ácidos grasos de las microalgas varía en función de factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes y el estado de la biomasa. Fernández et al. (2016) al cultivar *I. galbana* en medio marino enriquecido con un suplemento comercial, a un fotoperiodo 18/6 h luz/oscuridad; un 70% de los ácidos grasos detectados fueron ácido mirístico (C14:0), esteárico monoinsaturado (C18:1), el SDA y el DHA. Otro grupo de investigadores analizaron materia congelada de *I. galbana* y observaron que el ácido graso saturado más presente era el ácido mirístico (14:0), el ácido oleico (18:1  $\omega$ 9) que representaba más

de la mitad de los AG monoinsaturados y linoleico era el más representativo de los PUFAs (Bonfati *et al.*, 2018). Al comparar estos resultados con las aproximaciones obtenidas se presentan claras diferencias relacionadas al protocolo de cultivo, por ejemplo, al no introducirse ningún tipo de suplemento o vitamina en este, se pudo haber visto limitada la actividad metabólica de enzimas como las desaturasas por lo que se detectaron una mayor diversidad de posibles ésteres metílicos de ácidos grasos saturados (Chen *et al.*, 2023).

Para este estudio, la cuantificación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) resultó ser un reto debido a la insuficiencia de las muestras recolectadas. A pesar del esfuerzo para obtener muestras representativas, el volumen y la disponibilidad limitada de las muestras no permitieron realizar un análisis cuantitativo de los FAMEs. Esta dificultad técnica impactó en la capacidad de este estudio para proporcionar datos cuantitativos específicos sobre la cantidad de esterres metílicos de ácidos grasos en las muestras. Uno de los logros alcanzados es que se confirmó o validó la identificación de los compuestos en el espectrómetro de masas de alta resolución; sin embargo, debido a la cantidad insuficiente de muestras, tampoco por este método fue posible llevar a cabo su cuantificación.

Cabe mencionar que algunas de las causas que pudieron haber afectado el no poder efectuarse la cuantificación de FAMEs, se encuentra que el protocolo para la cuantificación ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía de gases se realizó para llevarse a cabo utilizando helio (también el protocolo de Supelco 37 recomienda utilizar Helio); sin embargo, debido a la disponibilidad limitada de recursos, se optó por utilizar nitrógeno. Es por ello y como se mencionó en el párrafo anterior que fue necesario confirmar la identificación de los compuestos mediante espectrometría de masas, ya que el CENIBiot no logró validar estadísticamente el protocolo de cromatografía de gases.

Además, por la razón mencionada en párrafos anteriores (debido a la insuficiencia de las muestras disponibles) no fue posible determinar la calidad del precursor de biocombustible producido en comparación con muestras comerciales. A pesar del esfuerzo para recolectar muestras representativas, las limitaciones en el tamaño y calidad de las muestras impidieron realizar una comparación adecuada de la calidad del biocombustible. Esta limitación técnica no permitió proporcionar datos comparativos significativos entre el biocombustible producido y las muestras comerciales disponibles. Dado lo anterior se decidió realizar un análisis termogravimétrico, este enfoque permitió evaluar las propiedades térmicas y la estabilidad del precursor de biocombustible producido, proporcionando información valiosa sobre su composición y comportamiento térmico en ausencia de datos comparativos directos con muestras comerciales; los resultados obtenidos evidencian que el precursor de biocombustible a partir de la biomasa de *Isochrysis galbana* presenta regiones en donde hay pérdida de masa en rangos de temperatura similares

al del estándar de biodiesel (200 a 300°C). Además, se presentan pérdidas de masa a temperatura superiores por lo que se requiere realizar operaciones para eliminar estos compuestos los cuales corresponden a restos de pared de la célula.

Finalmente, en el cuadro 12 se resumen los principales resultados de esta investigación, en este se observa en su conjunto el proceso de producción del precursor de biocombustible, desde la etapa de “upstream” hasta la etapa de “downstream”.y comparación con un biodiesel comercial, se modificó el procedimiento para la determinación de la calidad del precursor de biocombustible producido versus la calidad de biodiesel comercial; evaluándose la calidad únicamente del precursor de biocombustible producido de la biomasa de *I. galbana* mediante un análisis termogravimétrico.

**Cuadro 12.** Resumen de las mejores condiciones y parámetros para la producción del precursor de biocombustible a partir de la biomasa de la microalga autóctona *Isochrysis galbana*.

<b>Condiciones de cultivo y requerimientos ambientales de las microalgas</b>	Temperatura 30°C pH 7,0 Oxígeno disuelto 2 ppm Luz constante 24 h
<b>Requerimientos nutricionales y medio de cultivo</b>	F/2 Salinidad 28 ppm Nitrógeno reducido al 50%
<b>Tipo de cultivo</b>	Autotrófico
<b>Sistemas de cultivo de la microalga</b>	Fotobiorreactor – PBR
<b>Enfoques de cultivo por lotes, continuo y semicontinuo</b>	Continuo
<b>Valorización y uso de los lípidos</b>	Biocombustibles (específicamente biodiesel)
<b>Procesamiento de biomasa microalgal después del cultivo</b>	Centrifugación
<b>Extracción de los lípidos totales</b>	Folch (cloroformo/metanol)
<b>Reacción de transesterificación / Solventes</b>	Transesterificación directa enzimática en biomasa húmeda a temperatura de 30°C, pH 6.5 y concentración de metanol 2 M (cloroformo/metanol) y hexano
<b>Caracterización de los lípidos</b>	Cromatografía de gases
<b>Confirmación ésteres metílicos</b>	Espectrometría de masas de alta resolución
<b>Análisis termogravimétrico (TGA)</b>	Termogramas de las Muestras de Biodiesel, Precursor de Biodiesel de <i>Chlorella</i> e <i>Isocrysis</i>

## CONCLUSIONES

Como investigadores debemos buscar soluciones sostenibles y viables al problema energético, como los biocombustibles, en especial los de tercera generación. *Isochrysis galbana* es una microalga prometedora

en este sentido por su rendimiento; las condiciones de cultivo y requerimientos ambientales ideales fueron temperatura 30°C, pH 7,0, oxígeno disuelto 2 ppm, luz constante las 24 h y el tipo de cultivo autotrófico y continuo, en medio de cultivo F/2, a una salinidad de 28 ppm y en nitrógeno reducido al 50% en un sistema cerrado, el fotobiorreactor de 15 L, se alcanzó una densidad máxima de  $1,0 \times 10^8$  cél/mL y una absorbancia de 2,1 a 680 nm, lo que significó una productividad de 0,68 g/L en un volumen total de cultivo de 12L.

Por otro lado, sería interesante evaluar otros métodos de cultivo como el mixotrófico con glicerol o el híbrido de dos fases. Este ha sido descrito como una alternativa sumamente útil para mejorar tanto el rendimiento de la biomasa como la acumulación de lípidos

Se comentó en la sección de literatura los efectos de distintas longitudes de onda en el crecimiento de microalgas. Por lo que la productividad obtenida (0,68 g/L) se puede utilizar como un parámetro de comparación del crecimiento bajo luz blanca contra otras longitudes como la luz azul y roja

Hasta la fecha uno de los mejores métodos para extracción de los lípidos totales es el de Folch; con el cual nivel de lípidos se observó un rendimiento de 6,16 mg\*gDW<sup>-1</sup> de lípidos totales. Al analizar esta fracción se identificaron diez posibles ésteres de ácidos grasos: ácido caproico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Con esto se observa que aprovechar las enzimas endógenas de *I. galbana* como catalizadoras del proceso permite recuperar un perfil de ácidos grasos complejo y con presencia de moléculas con muchas aplicaciones a nivel farmacológico y nutricional como el EPA y DHA.

Un punto crítico en la metodología es el proceso de extracción. Es por ello que el llevar a cabo una serie de pretratamientos de tipo ultrasónico y enzimático pueden ser de suma utilidad para mejorar los rendimientos. Blanco Llamero et al. (2021) al aplicar una combinación de estos en diferentes microalgas incluyendo *N.gaditana* e *I. galbana* observaron un rendimiento de lípidos mayores hasta en un cien por ciento en comparación con métodos donde no se realizaron pretratamientos a las muestras de biomasa. Sin embargo, debe contemplarse que este proceso influye sobre todos los métodos posteriores y el coste global del biocombustible

Por primera vez en el país se utilizó la metodología de transesterificación directa enzimática con lipasas endógenas, a temperatura de 30°C, pH 6.5 y concentración de metanol 2 M. Además, por primera vez en el país la metodología se utiliza con especies de microalgas autóctonas y a nivel mundial es la primera vez que esta metodología se utiliza con una especie de microalga marina. Pueden utilizarse otras

recomendaciones de solventes que faciliten la obtención de un mayor volumen del precursor del biocombustible.

Si es posible contar con un patrón internos (no fue adquirirlos durante la pandemia los proveedores no se comprometían a importar este tipo de reactivo) para comprobar la identificación y cuantificación de los FAMES. Además, el uso de otras técnicas como la espectrometría de masas, podrían servir como un complemento para la identificación y caracterización de los ácidos grasos. Para el perfil de estos basándose en la literatura sería sugerible llevar a cabo extracciones a lo largo del crecimiento del cultivo con el fin de poder visualizar cómo evoluciona la concentración de ciertos lípidos de interés como el oleico, linoleico y linolénico.

## **RECOMENDACIONES**

Como recomendación para futuras investigaciones enfocadas en temas afines a la lipidómica de *I. galbana* es llevar a cabo volúmenes de cultivo que permitan obtener cantidades suficientes de biomasa, para que este no sea un factor limitante para poder llevar a cabo las distintas pruebas de biomasa y lípidos. Se recomienda un enfoque más riguroso en la recolección de muestras y una mayor atención a la calidad y cantidad de las muestras obtenidas. Algunas publicaciones recomiendan contar con alrededor de 15 mg de de biomasa húmeda, solo para el análisis de ácidos grasos por extracción con disolventes y cromatografía GC (De Almeida et al., 2011).

## **AGREDECIMIENTO**

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIE-TEC) por financiamiento y la colaboración al proyecto.

## **REFERENCIAS**

Abdoul-Latif, M., Oumaskour, K., Boujaber, N., Ainane, A., Mohamed, J., & Ainane, T. (2021). Formulations of a cosmetic product for hair care based on extract of the microalga *Isochrysis galbana*: in vivo and in vitro activities. *Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology*, 3(1), 15-19. doi: <https://doi.org/10.48402/IMIST.PRSM/jasab-v3i1.25015>

- Ali, Z., Subeshan, B., Alam, M. A., Asmatulu, E., and Xu, J. (2021). Recent progress in extraction/transesterification techniques for the recovery of oil from algae biomass. *Biomass Convers. Biorefinery* 13, 2553–2569. doi:10.1007/s13399-021-01326-y
- Alkhamis, Y. A., Mathew, R. T., Nagarajan, G., Rahman, S. M., & Rahman, M. M. (2022). pH induced stress enhances lipid accumulation in microalgae grown under mixotrophic and autotrophic condition. *Frontiers in Energy Research*, 10. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.1033068>
- Alkhamis, Y., & Qin, J. G. (2013). Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *BioMed Research International*, 2013, Article ID 983465, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/983465>
- Allemann, M. N., & Allen, E. E. (2018). Characterization and application of marine microbial omega-3 polyunsaturated fatty acid synthesis. *Methods in Enzymology*, 605, 3-32. DOI: 10.1016/bs.mie.2018.02.018
- Alsarayreh, M., Almomani, F., Khraisheh, M., Nasser, M. S., & Soliman, Y. (2022). Biological-Based Produced Water Treatment Using Microalgae: Challenges and Efficiency. *Sustainability*, 14(1), 499. <https://doi.org/10.3390/su14010499>
- Aussant, J., Guiheneuf, F., & Stengel, D. B. (2018). Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 5279–5297. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9001-x>
- Babu, A.G., Wu, X., Kabra, A.N., Kim, D.P., 2017. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. *Algal Res.* 23, 178–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.004>
- Balduyck, L., Dejonghe, C., Goos, P., Jooker, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2019). Inhibition of lipolytic reactions during wet storage of *T-Isochrysis lutea* biomass by heat treatment. *Algal Research*, 38, 101388. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101388>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Second Edition (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16544>
- Bhagea, R., Malleck Hossen, A., Ruhee, D., Puchooa, D., Bhooyroo, V., & Boodia, N. (2022). Microalgae as sources of green bioactives for health-enhancing food supplements and nutraceuticals: A review of literature. *American Journal of Biopharmaceutical and Pharmaceutical Sciences*, 2(10).
- Blanco-Llamero, C., García-García, P., & Señoráns, F. J. (2021). Combination of synergic enzymes and ultrasounds as an effective pretreatment process to break microalgal cell wall and enhance algal oil extraction. *Foods*, 10, 1928. <https://doi.org/10.3390/foods10081928>

- Bonfanti, C., Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S., & Bandarra, N. M. (2018). Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal Research*, 29, 242-248. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.035>
- Bousquet, O., Sellier, N., & Le Goffic, F. (1994). Characterization and purification of polyunsaturated fatty acids from microalgae by gas chromatography-mass spectrometry and countercurrent chromatography. *Chromatographia*, 39(1-2), 40–44. doi:10.1007/bf02320456
- Breuer, G., Evers, W. A. C., de Vree, J. H., Kleinegris, D. M. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2013). Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *Journal of Visualized Experiments*, Issue Number, doi:10.3791/50628.
- Brindhadevi, K., Mathimani, T., Rene, E. R., Shanmugam, S., Chi, N. T. L., & Pugazhendhi, A. (2021). Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. *Fuel*, 284, 119058. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119058>
- Bustamam, M. S. A., Pantami, H. A., Azizan, A., Shaari, K., Min, C. C., Abas, F., Nagao, N., Maulidiani, M., Banerjee, S., Sulaiman, F., et al. (2021). Complementary analytical platforms of NMR spectroscopy and LC-MS analysis in the metabolite profiling of *Isochrysis galbana*. *Marine Drugs*, 19, 139. <https://doi.org/10.3390/md19030139>
- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M.C., González-López, C. et al. Use of continuous culture to develop an economical medium for the mass production of *Isochrysis galbana* for aquaculture. *J Appl Phycol* 32, 851–863 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02015-0>
- Campa-Cordova, A.I., Luna-Gonzalez, A., Ascencio, F., Cortes-Jacinto, E., Caceres-Martínez, C.J., (2006). Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture* 260, 145e150. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.06.014
- Campuzano-Duque, L. F., & Cardeño-López, F. (2020). Composición de los ácidos grasos de genotipos de *Jatropha curcas* L., en Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 95-104. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37574>
- Cao, J.-Y., Kong, Z.-Y., Ye, M.-W., Ling, T., Chen, K., Xu, J.-L., Zhou, C.-X., Liao, K., Zhang, L., & Yan, X.-J. (2020). Comprehensive comparable study of metabolomic and transcriptomic profiling of *Isochrysis galbana* exposed to high temperature, an important diet microalgal species. *Aquaculture*, 521, 735034. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735034>
- Cao, J.-Y., Kong, Z.-Y., Ye, M.-W., Zhang, Y.-F., Xu, J.-L., Zhou, C.-X., Liao, K., & Yan, X.-J. (2019). Metabolomic and transcriptomic analyses reveal the effects of ultraviolet radiation deprivation on *Isochrysis galbana* at high temperature. *Algal Research*, 38, 101424. ISSN 2211-9264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101424>

- Cavonius, L. R., Carlsson, N.-G., & Undeland, I. (2014). Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods. *Anal Bioanal Chem*, 406, 7313–7322. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8155-3>
- C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.Y. Pontalier, C. Vaca-Garcia, Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35 (2014) 265–278, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- Chaos-Hernandez, D., Reynel-Avila, H. E., Bonilla-Petriciolet, A., & Villalobos-Delgado, F. J. (2023). Extraction methods of algae oils for the production of third generation biofuels – A review. *Chemosphere*, 341, 139856. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139856>
- Che, C. A., Kim, S. H., Hong, H. J., Kityo, M. K., Sunwoo, I. Y., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2019). Optimization of light intensity and photoperiod for *Isochrysis galbana* culture to improve the biomass and lipid production using 14-L photobioreactors with mixed light emitting diodes (LEDs) wavelength under two-phase culture system. *Bioresource Technology*, 285(212323), 1–7.
- Chen W, Li T, Du S, Chen H and Wang Q (2023), Microalgal polyunsaturated fatty acids: Hotspots and production techniques. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11:1146881. doi: 10.3389/fbioe.2023.1146881
- Chen, C. Y., Nagarajan, D., & Cheah, W. Y. (2018). Eicosapentaenoic acid production from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using deep sea water in outdoor plastic-bag type photobioreactors. *Bioresource Technology*, 253, 1-7. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.102
- Chhandama, M. V. L., Satyan, K. B., Changmai, B., Vanlalveni, C., & Rokhum, S. L. (2021). Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100771. doi:10.1016/j.biteb.2021.100771
- Chowdury, K.H., Nahar, N. and Deb, U.K. (2020) The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering*, 9, 185-215. <https://doi.org/10.4236/cweee.2020.94012>
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juarez-Campos, B., & Gonzalez-Hernandez, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>
- Das, U. N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal*, 1(4), 420–439. doi:10.1002/biot.200600012
- De Almeida De Sousa Furtado, J. L. C. (2011). Search for Mycosporine-like Amino Acids and Fatty Acids in *Isochrysis Galbana* and *Nannochloropsis Gaditana* (Order No. 28788403). ProQuest One Academic. (2585368845)
- Demirel, Y. (2018). Biofuels. In *Comprehensive Energy Systems*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809597-3.00125-5>

- Devos, M., Poisson, L., Ergan, F., & Pencreac'h, G. (2006). Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 548–554.
- Dragone, G. (2022). Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160, 112284. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112284>
- Eldiehy, K. S. H., Bardhan, P., Borah, D., Gohain, M., Rather, M. A., Deka, D., & Mandal, M. (2022). A comprehensive review on microalgal biomass production and processing for biodiesel production. *Fuel*, 324(Part C), 124773. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124773>
- El-Sheekh, M. M., Mansour, H. M., Bedaiwy, M. Y., et al. (2022). Influence of nutrient supplementation and stress conditions on the biomass and lipid production of *Microchloropsis salina* for biodiesel production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03434-9>
- Fang, J., Lin, A., Yuan, X., Chen, Y., He, W., Huang, J., Zhang, X., Lin, G., Zhang, J., & Xue, T. (2020). The complete chloroplast genome of *Isochrysis galbana* and comparison with related haptophyte species. *Algal Research*, 50, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101989>
- Fernández, T., Fernandes, I., Andrade, C. A. P., & Cordeiro, N. (2016). Changes in fatty acid biosynthesis in marine microalgae as a response to medium nutrient availability. *Algal Research*, 18, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.005>
- Ferreira, A. S., Pereira, L., Canfora, F., Silva, T. H., Coimbra, M. A., & Nunes, C. (2023). Stabilization of Natural Pigments in Ethanolic Solutions for Food Applications: The Case Study of *Chlorella vulgaris*. *Molecules*, 28(1), 408. <https://doi.org/10.3390/molecules28010408>
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166, 105–116. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00278-6
- Gharabaghi, M., Delavai Amrei, H., Moosavi Zenooz, A., Shahrivar Guzullo, J., & Zokae Ashtiani, F. (2015). Biofuels: Bioethanol, Biodiesel, Biogas, Biohydrogen from Plants and Microalgae. *CO2 Sequestration, Biofuels and Depollution*, 233–274. doi:10.1007/978-3-319-11906-9\_6
- Gnanakani, P. E., Amireddy, K., & Dhanaraju, M. D. (2023). Characterization and biofabrication of silver nanoparticles utilizing *Isochrysis* extract along with its in vitro antibacterial and antioxidant applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 57(2), 449–458. DOI: 10.5530/ijper.57.2.55.
- Gnouma, A., Sadovskaya, I., Souissi, A., Sebai, K., Medhioub, A., Grard, T., & Souissi, S. (2017). Changes in fatty acids profile, monosaccharide profile and protein content during batch growth of *Isochrysis galbana* (*T.iso*). *Aquaculture Research*, 48(9), 4982–4990. doi:10.1111/are.13316

- Gonzalez, B., Buitrago, E., & Frontado, K. (2023). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura.
- Grima, E. M., González, M. J. I., & Giménez, A. G. (2013). Solvent Extraction for Microalgae Lipids. In *Algae for Biofuels and Energy* (pp. 99–113). Springer. DOI: 10.1007/978-94-007-5479-9\_11
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., & Yang, J. (2014). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*, 61, 2012-2015.
- Hinga, K. R. (2002). Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 238, 281-300. <https://doi.org/10.3354/meps238281>
- Hotos GN, Bekiari V. Absorption Spectra as Predictors of Algal Biomass and Pigment Content of the Cultured Microalgae *Amphidinium carterae*, *Isochrysis galbana*, *Nephroselmis* sp., and *Anabaena* sp. *International Journal of Plant Biology.* 2023; 14(4):879-895. <https://doi.org/10.3390/ijpb14040065>
- Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Pencreac'h, G., Hérault, J., & Ergan, F. (2017). Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL*, 24(4), D407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017023>
- Islam, M. S., Castellucci, C., Fiorini, R., Greco, S., Gagliardi, R., Zannotti, A., Giannubilo, S. R., Ciavattini, A., Frega, N. G., Pacetti, D., & Ciarmela, P. (2018). Omega-3 fatty acids modulate the lipid profile, membrane architecture, and gene expression of leiomyoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 7143-7156. DOI: 10.1002/jcp.26537
- Jaiswal, K., Banerjee, I., Singh, D., Sajwan, P., & Chhetri, V. (2020). Ecological stress stimulus to improve microalgae biofuel generation: a review. *Octa Journal of Biosciences*, 8(1), 48-54.
- Ji, X., Cheng, J., Gong, D., Zhao, X., Qi, Y., Su, Y., & Ma, W. (2018). The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga— *Scenedesmus obliquus* XJ002. *Science of The Total Environment*, 633, 593–599. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.240
- Jin, M., Xiao, X., Qin, L., Geng, W., Gao, Y., Li, L., & Xue, J. (2020). Physiological and morphological responses and tolerance mechanisms of *Isochrysis galbana* to Cr(VI) stress. *Bioresource Technology*, 302, 122860. ISSN 0960-8524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122860>
- Jung, J., Sirisuk, P., Ra, C. H., Kim, J. M., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2019). Effects of green LED light and three stresses on biomass and lipid accumulation with two-phase culture of microalgae. *Process Biochemistry*, 77, 93–99.

- Jui, T. J., Tasnim, A., Islam, S. R., Manjur, O. H. B., Hossain, M. S., Tasnim, N., ... & Karim, M. R. (2024). Optimal growth conditions to enhance *Chlorella vulgaris* biomass production in indoor phyto tank and quality assessment of feed and culture stock. *Heliyon*.
- Khalil ZI, Asker MM, El-Sayed S, Kobbia IA. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010 Jul;26(7):1225-31. doi: 10.1007/s11274-009-0292-z. Epub 2009 Dec 30. PMID: 24026927.
- Kiani H, Aznar R, Poojary MM, Tiwari BK and Halim R (2022) Chromatographic Techniques to Separate and Identify Bioactive Compounds in Microalgae. *Front. Energy Res*. 10:904014. doi: 10.3389/fenrg.2022.904014
- Kusmayadi, A., Suyono, E. A., Nagarajan, D., Chang, J.-S., & Yen, H.-W. (2020). Application of computational fluid dynamics (CFD) on the raceway design for the cultivation of microalgae: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(4-5), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02273-9>
- Kwan, P. P., Banerjee, S., Shariff, M., & Md. Yusoff, F. (2020). Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.15023
- Langholtz, M. H., Coleman, A. M., Eaton, L. M., Wigmosta, M. S., Hellwinckel, C. M., & Brandt, C. C. (2016). Potential land competition between open-pond microalgae production and terrestrial dedicated feedstock supply systems in the U.S. *Renewable Energy*, 93, 201-214. DOI: 10.1016/j.renene.2016.02.052
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101.
- Lemahieu, C., Bruneel, C., Dejonghe, C., Buyse, J., & Foubert, I. (2016). The cell wall of autotrophic microalgae influences the enrichment of long chain omega-3 fatty acids in the egg. *Algal Research*, 16, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.015>
- Luna Ramírez, R.A. (2023). Asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno por la microalga *Isochrysis galbana*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 39 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3855>
- Matos, J., Afonso, C., Cardoso, C., Serralheiro, M. L. y Bandarra, N. M. (2021). Yogurt enriched with *Isochrysis galbana*: an innovative functional food. *Foods*, 10(7), 1- 16. doi: 10.3390/foods10071458
- Medina, E., Ruíz-Domínguez, M., Morales, J., & Cerezal, P. (2019). Fatty acid profile evaluation of *Isochrysis galbana* through the use of acid and alkaline transesterification methods. *Informador Técnico*, 83(1), 68-77. doi: <https://doi.org/10.23850/22565035.1574>
- Mendoza, Á., Morales, V., Sánchez-Bayo, A., Rodríguez-Escudero, R., González-Fernández, C., Bautista, L. F., & Vicente, G. (2020). The effect of the lipid extraction method used in biodiesel production on

- the integrated recovery of biodiesel and biogas from *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana* and *Arthrospira platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 154, 107428. ISSN 1369-703X. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107428>.
- Mimouni, V., Couzinet-Mossion, A., Ulmann, L., & Wielgosz-Collin, G. (2018). Lipids From Microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 109-131). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00005-0>
- Molina-Cárdenas, C. A., Licea-Navarro, A. F., & Sánchez-Saavedra, M. P. (2020). Effects of *Vibrio cholerae* on fatty acid profiles in *Isochrysis galbana*. *Algal Research*, 46, 101802. ISSN 2211-9264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101802>
- Moran, L., Bou, G., Aldai, N. et al. (2022). Characterisation of the volatile profile of microalgae and cyanobacteria using solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Sci Rep* 12, 3661 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07677-4>
- Mohammadi, F. S., Arabian, D., & Khalilzadeh, R. (2016). Investigation of effective parameters on biomass and lipid productivity of *Chlorella vulgaris*. *Periodicum biologorum*, 118(2).
- Mulgund, A. (2022). Increasing lipid accumulation in microalgae through environmental manipulation, metabolic, and genetic engineering: a review in the energy NEXUS framework. *Energy Nexus*, 5, 100054. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100054>
- Nalder T.D., Miller M.R. & Packer M.A. (2015) Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis sp (T.iso)* grown in batch culture. *Aquaculture International* 23, 1293-1312
- Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., & Schenk, P. M. (2016). Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. *Frontiers in Energy Research*, 4. doi:10.3389/fenrg.2016.00029
- Picardo, M. C., de Medeiros, J. L., de Queiroz F. Araújo, O., & Chaloub, R. M. (2013). Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and nutrients supply intermittency on batch cultures of *Isochrysis galbana*. *Bioresource Technology*, 143, 242-250.
- Pourseyed, M., Torres, S., Hooker, T., et al. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. *J Cannabis Res*, 2, 35. DOI: 10.1186/s42238-020-00040-2.
- Putra, Y., Mustikasari, I., Pangestuti, R., Rahmadi, P., & Siahaan, E. A. (2022). Fatty acid profiles and biological activity of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana*, clone t-ISO. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1083, 012079. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1083/1/012079>
- Riccio, G., Martinez, K. A., Ianora, A., & Lauritano, C. (2022). De Novo Transcriptome of the Flagellate *Isochrysis galbana* Identifies Genes Involved in the Metabolism of Antiproliferative Metabolites. *Biology*, 11(5), 771. <https://doi.org/10.3390/biology11050771>

- Ramírez-López, C., Perales-Vela, H. V., & Fernández-Linares, L. (2019). Biomass and lipid production from *Chlorella vulgaris* UTEX 26 cultivated in 2 m<sup>3</sup> raceway ponds under semicontinuous mode during the spring season. *Bioresource technology*, 274, 252-260.
- Rodríguez-España, M., Mendoza-Sánchez, L. G., Magallón-Servín, P., Salgado-Cervantes, M. A., Acosta-Osorio, A. A., & García, H. S. (2022). Supercritical fluid extraction of lipids rich in DHA from *Schizochytrium sp.* The Journal of Supercritical Fluids, 179, 105391. doi:10.1016/j.supflu.2021.105391
- Rodríguez-Luna, A., Talero, E., Terencio, M. C., González-Rodríguez, M. L., Rabasco, A. M., de los Reyes, C., Motilva, V., & Ávila-Román, J. (2018). Topical Application of Glycolipids from *Isochrysis galbana* Prevents Epidermal Hyperplasia in Mice. *Marine Drugs*, 16(1), 2. DOI: 10.3390/md16010002.
- Roopnarain, A., Sym, S. D., & Gray, V. M. (2015). Time of culture harvest affects lipid productivity of nitrogen-starved *Isochrysis galbana* U4 (Isochrysidales, Haptophyta). *Aquaculture*, 438, 12-16. ISSN 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.033>
- Salama, E.-S., Hwang, J.-H., El-Dalatony, M. M., Kurade, M. B., Kabra, A. N., Abou-Shanab, R. A. I., ... Jeon, B.-H. (2018). Enhancement of microalgal growth and biocomponent-based transformations for improved biofuel recovery: A review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.006>
- Sánchez, Á., Maceiras, R., Cancela, Á., & Pérez, A. (2013). Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy*, 101, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.027>
- Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., & Rodríguez, R. (2020). Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. *Renewable Energy*, 146, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.148>
- Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2019). Biodiesel Production (FAEEs) by Heterogeneous Combi-Lipase Biocatalysts Using Wet Extracted Lipids from Microalgae. *Catalysts*, 9, 296. <https://doi.org/10.3390/catal9030296>
- Señoráns, M., Castejón, N., & Señoráns, F. J. (2020). Advanced Extraction of Lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with Enzymatic Pre-Treatment Combined with Pressurized Liquids and Ultrasound Assisted Extractions. *\*Molecules*, 25\*, 3310. doi:10.3390/molecules25143310
- Shanmugam, S., Mathimani, T., Anto, S., Sudhakar, M. P., Kumar, S. S., & Pugazhendhi, A. (2020). Cell density, Lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. *Bioresource technology*, 304, 123061. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123061>

- Song, P., Zhang, L., & Li, Q. (2018). Response of photosynthetic apparatus of *Isochrysis galbana* to different nitrogen concentrations. *Bioresource Technology Reports*, 4, 74-79. ISSN 2589-014X. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.09.003>
- Spanjers, C. S., Beach, C. A., Jones, A. J., & Dauenhauer, P. J. (2017). Increasing flame ionization detector (FID) sensitivity using post-column oxidation–methanation. *Analytical Methods*, 9(12), 1928–1934. doi:10.1039/c6ay03363f
- Srivastava, R.K., Shetti, N.P., Reddy, K.R. et al. (2020). Biofuels, biodiesel and biohydrogen production using bioprocesses. A review. *Environ Chem Lett* 18, 1049–1072 <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00999-7>
- Su, J., Ye, M., Lou, Y., Yang, Z., Sun, T., Zhang, R., Xu, J., Zhou, C., Yan, X., (2017). Low molecular- mass organic acid and lipid responses of *Isochrysis galbana* Parke to high temperature stress during the entire growth stage. *Algal Res.* 26, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.011>
- Sukarni, Sukarni, Sumarli, Sumarli, Nauri, I. M., Purnami, Purnami, al Mufid, A., & Yanuhar, U. (2018). Exploring the prospect of marine microalgae *Isochrysis galbana* as sustainable solid biofuel feedstock. *Journal of Applied Research and Technology*, 16(1), 53-66. Retrieved on September 28, 2023, from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-64232018000100053&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-64232018000100053&lng=es&tlng=en).
- Sun, H., Zhao, W., Mao, X., Li, Y., Wu, T., & Chen, F. (2018). High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnol Biofuels*, 11, 227. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1225-6>
- Sun, Z., Wang, X., & Liu, J. (2019). Screening of *Isochrysis* strains for simultaneous production of docosahexaenoic acid and fucoxanthin. *Algal Research*, 41, 101545. ISSN 2211-9264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101545>
- Tan, N.-H., Liew, K.-S., Shi, C.-K., Muhamad Shaleh, S. R., & Lim, L.-S. (2021). Growth performance of brown-golden marine microalga, *Isochrysis sp.*, cultivated in alternative algal culture media. *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture*, 5(2), 57-62.
- Udayan, A., Pandey, A. K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B. I., Sim, S. J., ... & Pandey, A. (2022). Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews*, 1-28. <https://doi.org/10.1007%2Fs11101-021-09784-y>
- Verma, M. L., Kishor, K., Sharma, D., Kumar, S., & Sharma, K. D. (2020). Microbial production of omega-3 polyunsaturated fatty acids. En M. L. Verma & A. K. Chandel (Eds.), *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 293-326). Elsevier. ISBN 9780444643230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00010-2>.

- Wang, S., Yerkebulan, M., Abomohra, A. E.-F., El-Khodary, S., & Wang, Q. (2019). Microalgae harvest influences the energy recovery: A case study on chemical flocculation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel and crude bio-oil production. *Bioresource Technology*, 286, 121371. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121371.
- Wayne, C. K., Reen, C. S., Show, P. L., Jiun, Y. Y., Chuan, L. T., & Jo-Shu, C. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332-344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Widyaningrum, D., & Prianto, A. D. (2021). Chlorella as a Source of Functional Food Ingredients: Short review. *IOP Conference Series*, 794(1), 012148. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/794/1/012148>
- Wong, J. F., Hong, H. J., Foo, S. C., Yap, M. K. K., & Tan, J. W. (2022). A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. *Food Science and Human Wellness*, 11(5), 1156-1170.
- Wu, C., & He, C. (2019). Interaction effects of oxytetracycline and copper at different ratios on marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Chemosphere*, 225, 775-784. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.067>
- Yadav, D. K., Yadav, M., Rani, P., Yadav, A., Bhardwaj, N., Bishnoi, N. R., & Singh, A. (2023). Screening of best growth media for *Chlorella vulgaris* cultivation and biodiesel production. *Biofuels*, 15(3), 271–277. <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2235787>
- Yu, C.-C., Chen, H.-W., Chen, M.-J., Chang, Y.-C., Chien, S.-C., Kuo, Y.-H., Yang, F.-L., Wu, S.-H., Chen, J., Yu, H.-H., & Chao, L. (2010). Chemical Composition and Bioactivities of the Marine Alga *Isochrysis galbana* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 5, 1941-1944. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501222>
- Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M., Harun, R., Omar, R., & Siajam, S. I. (2020). Characterization on phenolic acids and antioxidant activity of Chlorella sp. microalgae using subcritical water extraction. *Sains Malaysiana*, 49(4), 765-774. <https://doi.org/10.17576/jsm-2020-4904-05>
- Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., et al. (2019). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>
- Zhang, H., Wang, Z., & Liu, O. (2015). Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(4), 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005>

- Zhang, Y., Zhang, X., Guo, R., Zhang, Q., Cao, X., Suranjana, M., & Liu, Y. (2020). Effects of florfenicol on growth, photosynthesis and antioxidant system of the non-target organism *Isochrysis galbana*. *Algal Research*, 50, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108764>
- Zheng, H., Ge, F., Song, K., Yang, Z., Li, J., Yan, F., Wu, X., Zhang, Q., Liu, Y., & Ruan, R. (2022). Docosahexaenoic acid production of the marine microalga *Isochrysis galbana* cultivated on renewable substrates from food processing waste under CO<sub>2</sub> enrichment. *Science of The Total Environment*, 848, 157654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157654>
- Zhu, Z., Sun J, Fa Y, Liu X and Lindblad P (2022). Enhancing microalgal lipid accumulation for biofuel production. *Front. Microbiol.* 13:1024441. doi: 10.3389/fmicb.2022.1024441
- Guldhe, A., Singh, B., Mutanda, T., Permaul, K., & Bux, F. (2015). Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.035>
- Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Pencreac'h, G., Hérault, J., & Ergon, F. (2016). State and trends of oil crops production in China; State and trends of oil crops production in China, 24(4), 407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017023>
- Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Pencreac'h, G., Hérault, J., & Ergon, F. (2017). Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL*. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017023>
- Kareem, S. O., Falokun, E. I., Balogun, S. A., Akinloye, O. A., & Omeike, S. O. (2017). Enzymatic biodiesel production from palm oil and palm kernel oil using free lipase. *Egyptian Journal of Petroleum*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.09.002>
- Kim, K. H., Lee, O. K., Kim, C. H., Seo, J. W., Oh, B. R., & Lee, E. Y. (2016). Lipase-catalyzed in-situ biosynthesis of glycerol-free biodiesel from heterotrophic microalgae, *Aurantiochytrium* sp. KRS101 biomass. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.092>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Newswire, P. R. (2015). World Marine Biotechnology Industry. *LON-Reportbuyer*.
- Qi, F., Pei, H., Mu, R., Ma, G., Wu, D., & Han, Q. (2019). Characterization and optimization of endogenous lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* SDEC-3M ability to rapidly accumulate lipid for reversing nightly lipid loss. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1493-9>
- Rodríguez-Castillo, G., Amarello-Santos, C., Guerrero-Barrantes, M., & dos Reis, A. D. (2016). Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *Chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible. *Revista Tecnología en Marcha*, ág-3.
- Skorupskaite, V., Makareviciene, V., & Gumbyte, M. (2016). Opportunities for simultaneous oil extraction

and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae: A review. *Fuel Processing Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.05.002>

Su, Y., Song, K., Zhang, P., Su, Y., Cheng, J., & Chen, X. (2017). Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 402–411. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.12.078>

Velasco Jiménez, N. (2017). Extracción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* para la producción de biodiesel. Tesis para optar al grado de Ing. Química, UCR. En colaboración con el ITCR y RECOPE.

## ANEXOS

En los anexos que se presentan a continuación se evidencian las actividades que se han trabajado en el proyecto hasta diciembre del 2023.

### Anexo 1 Protocolos relacionados con el medio de cultivo, conteo celular y determinación de peso seco de los cultivos de microalgas.

#### Nombre del procedimiento

Preparación del Medio de Cultivo BG11

- I. **OBJETIVO:** Preparar el medio de cultivo BG11 el cual es una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura el crecimiento de microalgas.
- II. **ALCANCE:** Aportar los micronutrientes y macronutrientes en las concentraciones ideales que le permitan a las células crecer y mantenerse en un estado metabólico idóneo.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES** N/A
- IV. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Medio de cultivo. Micronutrientes. Macronutrientes
- V. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- VI. **DOCUMENTOS ASOCIADOS** N/A
- VII. **MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

Macronutrientes	Micronutrientes	Equipos/Utensilios
Agua ultrapura	Trace Metals	Balanza analítica
NaNO <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Balanza granataria
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	Probetas
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Beakers
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Botellas de 250 ml, 1 L y 2 L
Citric Acid	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	
Ammonium Ferric Citrate	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	

MgNa <sub>2</sub> EDTA H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		
---	--	--

### VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO

Medio de cultivo BG11 (Allen and Stainer 1968, Rippka et al. 1979)			
Número	Componente	Solución Stock (g.L-1 dH <sub>2</sub> O)	Adicción por litro de medio de cultivo
1	NaNO <sub>3</sub>		1,5 g
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	40	1 ml
3	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	75	1 ml
4	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	36	1 ml
5	Citric Acid	6	1 ml
6	Ammonium Ferric Citrate	6	1 ml
7	MgNa <sub>2</sub> EDTA . H <sub>2</sub> O	1	1 ml
8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1	1 ml
9	Elementos traza		1 ml

Elementos traza		
Número	Metal	Adicción por litro de agua bidestilada
1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
2	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,81 g
3	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,22 g
4	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,39 g
5	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,08 g
6	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,05 g

**Preparación de la solución de cultivo:** Añada los productos químicos y las soluciones madre indicados anteriormente a 1000 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH y autoclavar.

#### Nombre del procedimiento

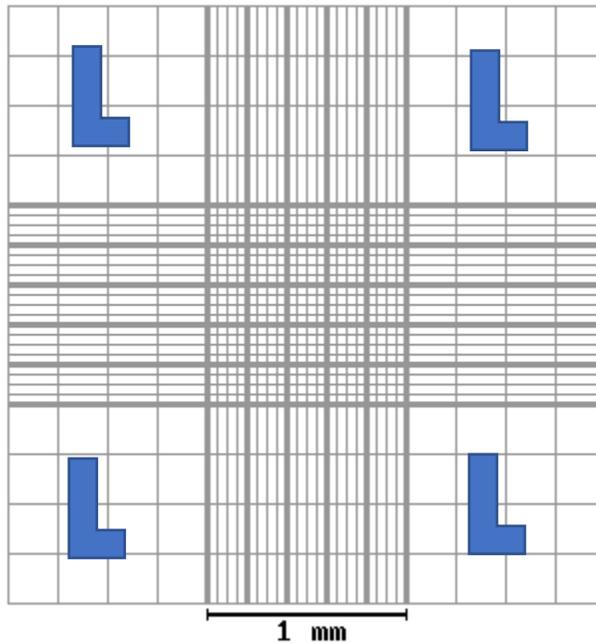
Recuento de células

- I. **OBJETIVO:** Determinar la concentración de células microalgales en un cultivo.
- II. **ALCANCE:** Obtener conteos celulares precisos, consistentes y rápidos de cultivos microalgales.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IV. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Concentración celular. Cámara de Neubauer.
- V. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- VI. **DOCUMENTOS ASOCIADOS:** N/A
- VII. **MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

Material	Equipo
Muestra del cultivo microalgal	Cámara de Neubauer Cubre objetos

## VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO

### a. Recuento de células grandes

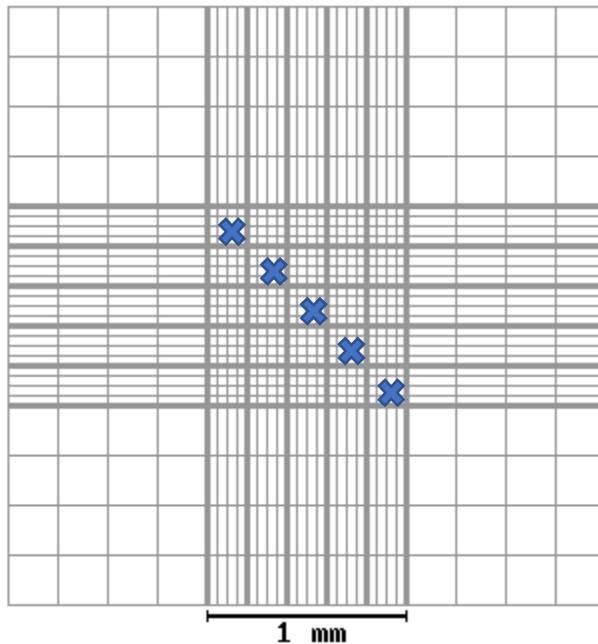


**Figura 1.** Cuadrícula de la cámara de Neubauer, donde se señalan los 4 cuadrados grandes.

- Las células de microalgales se contabilizan utilizando una cámara de Neubauer.
- Las células en un estadio de mayor tamaño se contabilizan en los cuadrados grandes, señalados con una L mayúscula en color azul en la figura 1.
- De la muestra del cultivo de microalgas se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  a la una cámara de Neubauer.
- La fórmula utilizada para calcular la concentración celular por mililitro es:

Concentración celular (célula/mL) = Número de células totales contadas x 10 000 / Número de cuadrados

### b. Recuento de células pequeñas



**Figura 1.** Cuadrícula de la cámara de Neubauer, donde se señalan los 5 cuadrados pequeños en diagonal del cuadrado central.

- a. Las células de microalgales se contabilizan utilizando una cámara de Neubauer.
- b. Las células en un estadio de menor tamaño se contabilizan en los cuadrados pequeños, señalados con una X mayúscula en color azul en la figura 2.
- c. De la muestra del cultivo de microalgas se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  a la una cámara de Neubauer.
- d. La fórmula utilizada para calcular la concentración celular por mililitro es:

Concentración celular (célula/mL) = Número de células totales contadas x 200 000

### **Nombre del procedimiento**

Determinación del peso seco

- I. **OBJETIVO:** Determinar el peso seco de la biomasa de microalgas.
- II. **ALCANCE:** Esta técnica permite determinar el peso de las células cuando todo el contenido de agua es removido.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IV. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Peso seco
- V. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- VI. **DOCUMENTOS ASOCIADOS** N/A

## VII. MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS

Material	Equipo
Muestra del cultivo microalgal	Centrífuga
Agua ultrapura	Estufa

## VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO

- a. El peso seco de la biomasa se determina tras el lavado de las células del cultivo. Se concentran 8 mL de muestra del cultivo por centrifugación a 3000 xg durante 5 min.
- b. El sobrenadante se descarta y se sustituye por agua ultrapura para el lavado. La muestra se agita antes de realizar una segunda centrifugación en las mismas condiciones.
- c. El sobrenadante se desecha de nuevo y se sustituye por agua ultrapura. Se agita la muestra antes de una tercera centrifugación en las mismas condiciones.
- d. Se descarta el sobrenadante y se recoge el pellet celular con una pequeña cantidad de agua ultrapura, se colocó en una placa adaptada y se determina el peso seco de la biomasa tras secar la biomasa hasta un peso constante en una estufa a 105°C durante 24 horas.

### Anexo 2 Protocolos relacionados con la extracción de lípidos de la cosecha de biomasa de los cultivos de microalgas.

#### Nombre del procedimiento

Extracción de Folch modificada para la cuantificación de lípidos totales (g.gDW-1)

- I. **OBJETIVO:** Cuantificar los lípidos totales de la biomasa de microalgas.
- II. **ALCANCE:** La extracción de Folch es útil para la extracción de lípidos totales sin alterar su calidad ni cantidad.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IV. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Hidroxitolueno butilado (BHT). Cloroformo. Metanol.
- V. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- VI. **DOCUMENTOS ASOCIADOS:** N/A
- VII. **MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

Material	Equipo
Muestra de biomasa de microalgas	Probeta o pipeta
Mezcla cloroformo/metanol 2:1 con 0,1g de BHT	Agitador rotatorio
Agua ultrapura con 0,8% de KCl	Balanza granataria
	Viales de tornillo

### VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO

- a. El contenido de lípidos totales en la biomasa se determina utilizando un protocolo modificado del método de Folch, Lees y Stanley (1957). La extracción de lípidos se realiza con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) que contiene 0,1 mg/mL de hidroxitolueno butilado (BHT).
- b. Se mezclan 2 g de muestra de biomasa (gDW/L) con 5 mL del disolvente durante 24 horas a 30°C bajo agitación con un agitador rotatorio a 500 rpm.
- c. A continuación, la mezcla se lavó dos veces con agua ultrapura que contenía 0,8% de KCl.
- d. Después se realiza una agitación manual seguida de centrifugación a 3000 xg durante 5 min a 4°C.
- e. La fase orgánica inferior se recupera en un vial de tornillo previamente tarado, y el disolvente se evapora bajo flujo de nitrógeno.
- f. El contenido total de lípidos (expresado como gramo de lípidos por g de peso seco de la biomasa: (g.gDW-1) corresponde a la masa ponderada en el vial y reportada a los 2 g de biomasa utilizados.

**Nombre del procedimiento**  
Extracción con cloroformo/metanol

- I. **OBJETIVO:** Extraer lípidos totales de las biomásas de microalgas.
- II. **ALCANCE:** Este método se utiliza para el análisis de lípidos totales en las biomásas.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IX. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Hidroxitolueno butilado (BHT). Cloroformo. Metanol.
- IV. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- V. **DOCUMENTOS ASOCIADOS:** N/A
- VI. **MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

Material	Equipo
Muestra de biomasa de microalgas Mezcla cloroformo/metanol 2:1 con 0,1g de BHT	Probeta o pipeta Agitador rotatorio Balanza granataria Viales de tornillo Micropipeta de 100µL y 1000 µL y punta

### VII. FASES DEL PROCEDIMIENTO

- a. Los lípidos totales de las muestras se extraen con cloroformo:metanol (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 2:1 v/v) añadido con 0,1 mg/mL de BHT.

- b. Después, se añaden 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (2:1) a las muestras, que se agitan manualmente durante 1 min.
- c. A continuación, las muestras se centrifugan a 16000 xg durante 10 min a 4°C.
- d. La fase orgánica (capa inferior) se recoge en un nuevo vial. El pellet restante se re-extrae con 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  y se centrifuga de nuevo como se ha indicado anteriormente y la nueva fase orgánica se transfiere al mismo vial para su posterior análisis. Realizar las extracciones por triplicado.

**Anexo 3 Protocolos reaccionados con la preparación de muestras, curva de calibración y condiciones para el análisis de muestras en el cromatógrafo de gases (GC).**

**Nombre del procedimiento**

Extracción con hexano

- I. OBJETIVO:** Extraer FFA y FAEE de las biomazas de microalgas.
- II. ALCANCE:** Este método se utilizó para el análisis de FFA y FAEE en las biomazas.
- III. NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IV. TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Ácido graso láurico (C12 FA). Éster etílico del ácido láurico (C12 EE). Flujo de nitrógeno
- V. RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- VI. DOCUMENTOS ASOCIADOS:** Procedimiento código 02.
- VII. MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

Material	Equipo
Muestra de biomasa de microalgas Mezcla de metanol: ácido sulfúrico 14:1 Hexano	Centrífuga Falcón Viales Micropipeta de 100 $\mu\text{L}$ y 1000 $\mu\text{L}$ y puntas

**VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO**

- a. Los lípidos neutros de las muestras se extrajen con hexano.
- b. Después, se añaden 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de ácido graso láurico (C12 FA) y éster etílico del ácido láurico (C12 EE), a 2,5  $\mu\text{mol/mL}$ , como estándar interno para las extracciones.
- c. A continuación, se añaden 75  $\mu\text{L}$  de una mezcla de metanol y ácido sulfúrico (14:1) y 500  $\mu\text{L}$  de hexano.
- d. Las muestras se agitan horizontalmente durante 10 minutos y se centrifugan a 16000 xg durante 10 minutos a 4°C.
- e. La fase orgánica (capa superior) se recogió en un nuevo vial. El pellet restante se re-extrae con 500  $\mu\text{L}$  de hexano y se centrifugó de nuevo como se ha indicado anteriormente, y la fase orgánica se transfiere al mismo vial.
- f. Las muestras secas se resuspenden en 50  $\mu\text{L}$  de hexano para su posterior análisis por GC-FID. Realizar las extracciones por triplicado.

### Nombre del procedimiento

#### Curva de calibración GC-FID utilizando mezclas de ésteres etílicos y ácidos grasos.

- I. **OBJETIVO:** Determinar la concentración de una sustancia (analito - ésteres etílicos y ácidos grasos) en una muestra de biomasa de microalgas.
- II. **ALCANCE:** Entender la respuesta instrumental de un analito (ésteres etílicos y ácidos grasos) y para predecir la concentración del analito en una muestra de biomasa de microalgas.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IV. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID). Ésteres etílicos y ácidos grasos. Sililación. Derivatización.
- V. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.
- VI. **DOCUMENTOS ASOCIADOS:** Procedimiento código 01 y 02.
- VII. **MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

Equipo
Cromatógrafo de gases acoplada a un detector de ionización

#### VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO

- a. Se realizan curvas de calibración utilizando mezclas de ésteres etílicos y ácidos grasos de C10, C14, C15, C16, C16:1, C18, C18:1 y C18:2 dentro de un rango de concentración de 0 a 1000 nmol/mL) preparadas según el mismo protocolo que para las reacciones enzimáticas.

### Nombre del procedimiento

#### Análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID)

- I. **OBJETIVO:** Cuantificar e identificar los ácidos grasos libres y los ésteres etílicos de los ácidos grasos.
- II. **ALCANCE:** La cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID) se utiliza para el análisis de los lípidos.
- III. **NORMATIVA Y CRITERIOS APLICABLES:** N/A
- IV. **TÉRMINOS Y DEFINICIONES:** N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA). Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID). Sililación
- V. **RESPONSABLES:** Karla Meneses Montero.

**VI. DOCUMENTOS ASOCIADOS:** Procedimiento código 02.

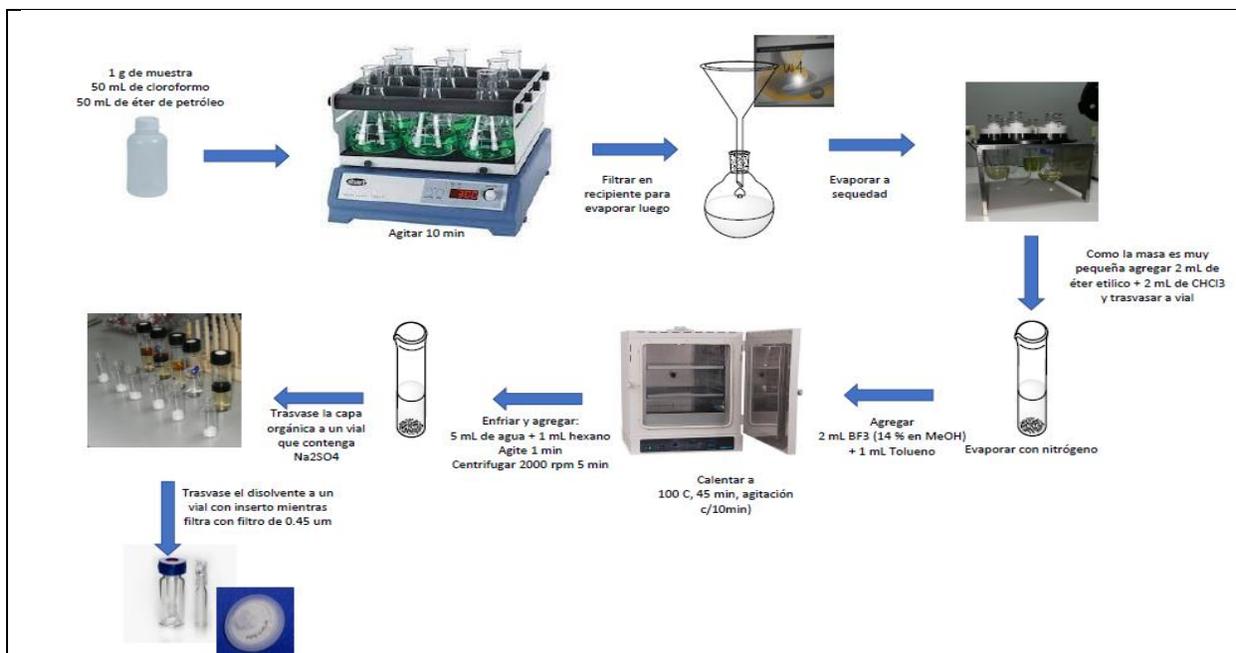
**VII. MATERIALES, EQUIPOS Y SISTEMAS**

<b>Material</b>	<b>Equipo</b>
Muestras de la extracción con hexano N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida Piridina	Cromatógrafo de gases acoplada a un detector de ionización

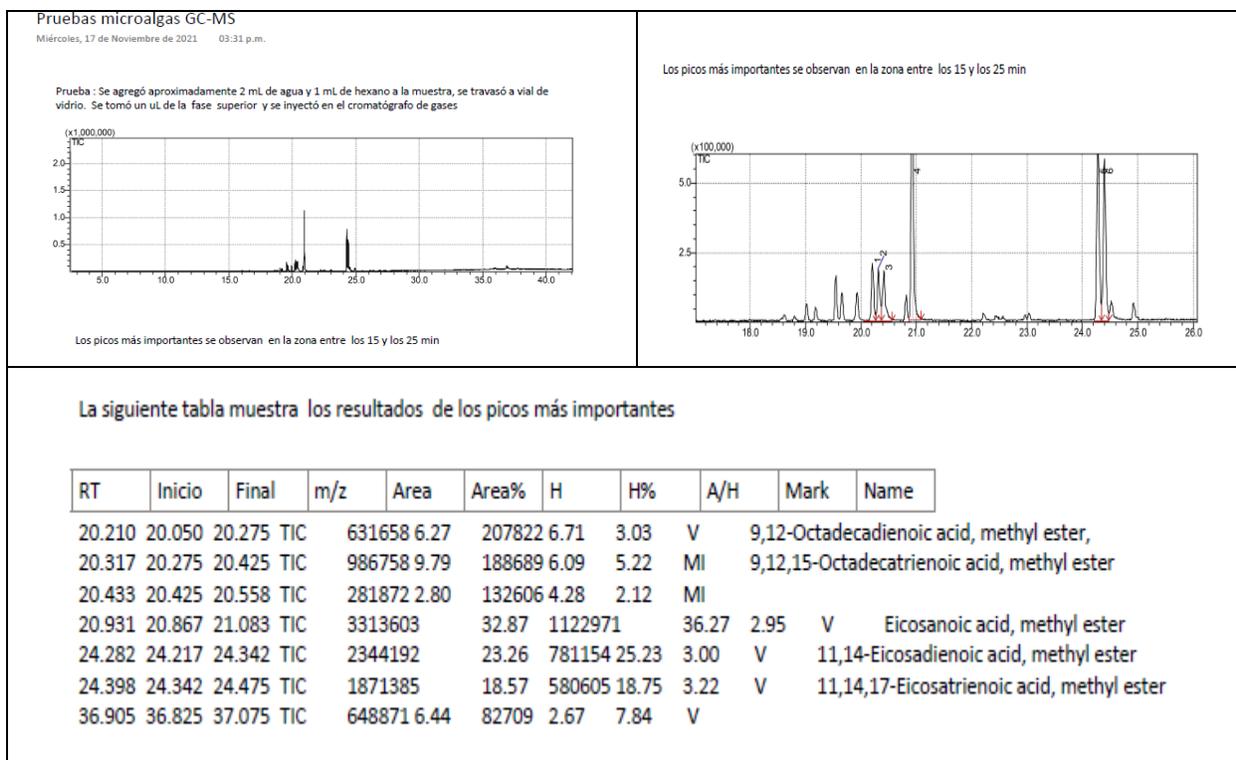
**VIII. FASES DEL PROCEDIMIENTO**

- a. Las muestras procedentes de la extracción con hexano se derivatizan por sililación con N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) para mejorar la volatilidad de las muestras para ser analizadas por cromatografía de gases (GC).
- b. Para ello, se añaden 25 µl de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) y 25 µl de piridina (catalizador) a 50 µl de la fase orgánica (extracto de hexano) y se incuban a 50 °C durante 20 min en un baño de agua.
- c. Los análisis GC se realizan con un cromatógrafo equipado con un sistema de muestreo automático, un inyector programable por temperatura (PTV) con división de flujo, un FID y una columna capilar de fase de sílice fundida recubierta de poliimida para análisis a alta temperatura.
- d. La señal se registra y analiza con el software del equipo.
- e. Los parámetros analíticos son los siguientes Caudal de helio (fase móvil): 1 mL·min<sup>-1</sup>, relación de división: 5; temperaturas analizadas: Inyector: gradiente de 290 a 400°C (200°C·min<sup>-1</sup>) y retención de 36,45 min a 400°C, Horno: gradiente de 150 a 230°C (5°C·min<sup>-1</sup>), luego de 230 a 250°C (2°C·min<sup>-1</sup>), luego, de 250 a 390°C (35°C·min<sup>-1</sup>) y retención de 5 min a 400°C; detector FID: 400°C; Volumen de inyección de la muestra: 0,5 µL.
- f. Los resultados se expresaron como la media de 3 repeticiones experimentales independientes ± desviación estándar.

**Anexo 4 Imagen del protocolo de la extracción directa de lípidos y esterificación de ácidos grasos.**



## Anexo 5 Análisis de lípidos preliminares de la biomasa de la microalga *Isochrysis galbana*



## **Anexo 6 Publicación científica relacionada con el cultivo y el aumento de la densidad celular en cultivos de *Isochrysis galvana*.**

### **Efectos de la longitud de onda de luz, el fotoperiodo y la salinidad en la cinética de crecimiento de *Isochrysis galvana*.**

Silvia Ramírez- Flores<sup>1,2</sup>; ORCID 0000-0002-4809-8022

Francinie Murillo-Vega <sup>3</sup>; ORCID: 0000-0002-2751-8390

Fabian Villalta- Romero<sup>3</sup>; ORCID: 0000-0001-7484-8125

Maritza Guerrero- Barrantes<sup>3</sup>; ORCID: 0000-0002-8253-5919

1. Universidad Técnica Nacional, Dirección de Investigación y Transferencia, Sede Pacífico. Costa Rica. sramirezf@utn.ac.cr

2. Maestría en Ciencias y Tecnología para la Sostenibilidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica / Universidad Nacional. Costa Rica. sramirezf@utn.ac.cr

3. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

### **Resumen**

**Introducción:** La producción de *Isochrysis galvana* en los criaderos de ostras es de suma importancia, de la calidad nutricional de esta microalga dependerá que las larvas obtengan los nutrientes necesarios para su desarrollo óptimo. El desarrollo de esta actividad en Costa Rica está en crecimiento para ello se requiere optimizar la producción de esta microalga por medio de la optimización de los reactores de cultivo esto para producir mayor cantidad y calidad de biomasa. **Objetivo:** Medir el efecto que tienen las variables de longitud de onda de luz, fotoperiodo y salinidad en la cinética de crecimiento de *Isochrysis galvana*. **Métodos:** El estudio se realizó de marzo a junio del 2021, se aplicaron 2 colores de luces LED (Blanca y azul) se realizaron 2 bioensayos con las longitudes de onda de luz azul y blanca, en cada longitud de onda de luz se probaron 3 fotoperiodos 16h:8h, 12h:12 h y 24h(L/O), en cada fotoperiodo se probaron 4 salinidades (32ppm, 30ppm, 28ppm y 25ppm). Cada salinidad se trabajó por triplicado para un total de 12 unidades experimentales por fotoperiodo cada una con capacidad de 5.5 litros. N= 72. **Resultados:** Después de 12 días de cultivo se observó que la mayor densidad celular se alcanzó en el tratamiento de luz azul con irradiación constante 24h y salinidad de 28ppm, El fotoperiodo de 12h:12h (L/O) no tuvo en buen crecimiento en ninguna de las longitudes de onda de luz empleadas. En cuanto a la producción de biomasa se determinó que el tratamiento de luz azul, fotoperiodo 16L:8O y salinidad de 30ppm fue el que tuvo un mayor peso de la biomasa seca. **Discusión:** El bioensayo permitió determinar que hay un efecto positivo de los factores de salinidad, color de luz y fotoperiodo sobre el aumento de la densidad celular en cultivos de *Isochrysis galvana*. La combinación de factores de luz azul con irradiación constante 24h y salinidad de 28ppm permitieron alcanzar la mayor densidad celular en el cultivo esto por el efecto directo de estos factores en la tasa de fotosíntesis al mejorar la eficiencia de los pigmentos fotosintéticos para capturar electrones.

## **Anexo 7 Publicación científica relacionada con el cultivo, perfil bioquímico y optimización de parámetros para mejorar el crecimiento y la producción de lípidos en *Isochrysis galvana*.**

### **Reviewing *Isochrysis galvana* for biofuel production: cultivation, biochemical profile and optimized parameters for enhanced growth and lipids production.**

Karla Meneses-Montero<sup>1\*</sup>, Dorian Rojas-Villalta<sup>1</sup>, Cristófer Orozco-Ortiz<sup>2</sup>, Melissa González-Sanabria<sup>2</sup>, Alexis Jerez-Navarro<sup>1</sup>, Olman Gómez-Espinoza<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Research Center, Department of Biology, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago 159-7050, Costa Rica; K.M.-M.: [kmeneses@itcr.ac.cr](mailto:kmeneses@itcr.ac.cr); D.R.-V.: [rojasvillaltadorian@gmail.com](mailto:rojasvillaltadorian@gmail.com); A.J.-N.: [alexisjn02@estudiantec.cr](mailto:alexisjn02@estudiantec.cr); O.G.-E.: [oespinoza@itcr.ac.cr](mailto:oespinoza@itcr.ac.cr)

<sup>2</sup> Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), CeNAT-CONARE, 1174-1200, Pavas, San José, Costa Rica; C.O.-O.: [corozco@cenat.ac.cr](mailto:corozco@cenat.ac.cr); M.G.-S.: [mgonzalez@cenat.ac.cr](mailto:mgonzalez@cenat.ac.cr)

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco 1145, Chile; [o.gomez01@ufromail.cl](mailto:o.gomez01@ufromail.cl)

\* Corresponding author

Karla Meneses-Montero

[kmeneses@itcr.ac.cr](mailto:kmeneses@itcr.ac.cr)

## Abstract

*Isochrysis galbana* has been the subject of study in terms of its biological characteristics. Its genome has recently been sequenced, which has allowed the identification of its genes and a better understanding of its biology. The combination of the inherent biochemical characteristics of *I. galbana* with the optimization of cultivation conditions represents a crucial aspect in the production of biofuels, where both cultivation conditions and processing systems play a fundamental role. The processing of microalgal biomass from *I. galbana* involves a series of critical steps for efficiently obtaining the desired lipids for biofuel production. Centrifugation stands out as the most used method commercially and the storage of harvested biomass is crucial to avoid lipolysis since / given that affect the efficiency and production costs of biofuels. Through the collection and evaluation of data from previous research, specific cultivation conditions can be identified that improve the growth rate, lipid production, and lipid content of *I. galbana*, then optimized cultivation of *I. galbana* for biofuel production represents a significant area of research and development in the field of renewable energies. Finally, molecular, and genetic strategies represent a promising direction for enhancing lipid accumulation in *I. galbana*, a microalga of great interest in the bioenergy industry. The combined use of genetic and molecular techniques with optimized cultivation parameters promises to boost the growth and lipid production of this microalga, opening new opportunities in the future bioenergy industry.

**Keywords:** bioenergy, microalgae, culture conditions, green technologies, biodiesel.