

DESARROLLO DE UNA RUTA ESTRATEGICA QUE RELACIONA LA  
PROPORCION CARBONO NITROGENO (C/N) ALIMENTADO AL CULTIVO DE  
*Chlamydomonas reinhardtii* CON LA CALIDAD DEL BIODIESEL

LAURA LORENA CARDOSO CHICUÉ  
YURI TATIANA PRIETO CRISTANCHO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ, D. C.  
2016

DESARROLLO DE UNA RUTA ESTRATEGICA QUE RELACIONA LA  
PROPORCION CARBONO NITROGENO (C/N) ALIMENTADO AL CULTIVO DE  
*Chlamydomonas reinhardtii* CON LA CALIDAD DEL BIODIESEL

LAURA LORENA CARDOSO CHICUÉ  
YURI TATIANA PRIETO CRISTANCHO

Proyecto integral de Grado para optar el título de  
INGENIERO QUÍMICO

Director  
ANDRÉS FERNANDO GONZALEZ BARRIOS  
Ingeniero Químico

Codirector  
ELIZABETH TORRES GAMEZ  
Ingeniera Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ, D. C.  
2016

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

Bogotá, D.C., Noviembre de 2016

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro.

**Dr. JAIME POSADA DÍAZ**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos.

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Posgrados.

**Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS**

Secretario General.

**Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA**

Decano Facultad de Ingenierías.

**Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI**

Director Programa de Ingeniería Química.

**Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIÉRREZ**

Las Directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo de docentes no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

Dedico este proyecto de grado a Dios, por darme la sabiduría para poder cumplir con este sueño que algún día imagine, a mi madre Nelly Chicué por la fuerza que siempre me daba para ir cumpliendo los retos que se me iban poniendo en el camino, a mi padre Jorge Humberto Cardoso por darme ese gran ejemplo que con responsabilidad todo se puede cumplir, a Luz Mirian Vera por creer siempre en mí, a mis hermanos porque siempre me ven como un ejemplo de perseverancia y a mis amigos de la vida, porque cada uno de ellos puso el granito para poder ser la ingeniera química que siempre soñé.

Dedico este trabajo a Dios y en especial a mis padres Javier Prieto Mahecha y Liliana Cristancho Sanchez quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional en cada paso de mi carrera y sobre todo en los momentos de crisis , a mi hermano Sebastian Prieto quien siempre estuvo allí brindándome tranquilidad, a mis abuelos Berenice Mahecha y Jorge Cristancho gracias por su legado de cumplimiento, esfuerzo y responsabilidad y a todos mis familiares y amigos que me apoyaron para finalizar con éxito este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Finalizando este trabajo de grado ofrecemos nuestros sinceros agradecimientos a todas las personas que directa o indirectamente participaron leyendo, opinando y corrigiendo cada uno de los avances presentados durante la realización de este trabajo.

A la Universidad de América, por brindarnos los conocimientos previos aplicados durante el desarrollo de este proceso investigativo.

A la Universidad de los Andes, por proporcionar los elementos para realizar con éxito esta investigación.

Al grupo de investigación de Diseño de Productos y Procesos, por dejar a disposición de esta investigación las herramientas necesarias y los estudios previos realizados que aportaron a la realización de este proyecto.

Al ingeniero Andrés González Barrios, quien como director, fue guía y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A la ingeniera Elizabeth Torres Gámez, quien como codirectora, represento un apoyo y colaboración de este proyecto.

A la ingeniera Daniela Mora, quien con su inmensa paciencia, siempre estuvo dispuesta a despejar nuestras dudas y a asesorar esta investigación.

A nuestras familias por brindarnos el apoyo económico y moral, que fue lo más importante en este proceso, gracias a ellos por su esfuerzo y ánimo para finalizar con éxito este proyecto.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 MICROALGAS	23
1.1.1 Función fotosintética	25
1.1.2 Fijación fotosintética del CO <sub>2</sub>	26
1.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	29
Morfología, reproducción y composición	29
1.3 CULTIVO DE MICROALGAS	31
Factores que influyen en el crecimiento y producción de biomasa	32
1.4 PARAMETROS DE CULTIVO	32
1.4.1 Luz	33
1.4.2 pH	33
1.4.3 Nutrientes	33
1.4.4 Temperatura	33
1.4.5 Salinidad	33
1.4.6 Agitación	34
1.5 CONTENIDO LIPÍDICO DE MICROALGAS	34
1.5.1 Síntesis de lípidos	35
1.5.2 Condiciones ambientales que afectan la acumulación de lípidos	36
1.5.3 Ácidos grasos en microalgas	37
1.6 BIODIESEL	38
1.6.1 Producción de biodiesel a partir de microalgas	39
1.6.2 Transesterificación	39
1.6.3 Esteres de metilo (FAME)	40
1.7 PROPIEDADES DEL BIODIESEL	41
1.7.1 Viscosidad cinemática	41
1.7.2 Número de cetano	42
1.7.3 Punto de inflamación	42
1.7.4 Propiedades de flujo a baja temperatura	42
1.8 MODELAMIENTO DE REDES GENÓMICAS	42
1.8.1 Modelo <i>iAM303</i> . Análisis de redes metabólicas integrados con transcripción de genes secuenciados	45
1.8.2 Reconstrucción genómica <i>iRC1080</i> de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	49
1.8.3 Análisis <i>in silico</i> para síntesis de biomasa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> evaluando diferentes concentraciones de CO <sub>2</sub> mediante un modelo FBA	51
1.8.4 Análisis de Balance de Flujo (FBA)	54

2.	METODOLOGIA	55
2.1	IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO FBA	55
2.1.1	Obtención de la red metabólica basada en la fijación de CO <sub>2</sub> de <i>C. reinhardtii</i>	57
2.1.2	Creación de la matriz estequiométrica basada en la reconstrucción de la red metabólica	59
2.1.3	Desarrollo del problema de programación lineal del modelo FBA en el software GAMS®	60
2.1.4	Curación de la red metabólica de <i>C. reinhardtii</i>	62
2.1.5	Evaluación del efecto del nitrógeno en el modelo de red metabólica de <i>C. reinhardtii</i>	63
2.1.6	Determinación de los valores de C/N que favorecen la producción de lípidos en <i>C. reinhardtii</i>	63
2.2	ASOCIACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO OBTENIDO DEL MODELO FBA DE <i>C. reinhardtii</i> CON LAS PROPIEDADES DEL BIODIESEL	65
2.2.2	Caracterización de triglicéridos y ácidos grasos obtenidos mediante el modelo de programación FBA de <i>C. reinhardtii</i>	65
2.2.3	Transesterificación y esterificación teórica de los triglicéridos y ácidos grasos caracterizados	66
2.2.4	Caracterización de ésteres de metilo (FAME)	68
2.2.5	Aplicación de correlaciones para determinar propiedades de biodiesel	68
3.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS	70
3.1	IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO FBA EN GAMS®	70
3.1.1	Curación de la red metabólica reconstruida de <i>C. reinhardtii</i>	70
3.1.2	Evaluación del efecto de la relación C/N en el modelo FBA	70
3.1.3	Composición lipídica obtenida por medio de la simulación del crecimiento de la biomasa de <i>C. reinhardtii</i>	71
3.2	RUTA ESTRATÉGICA QUE ASOCIA LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA CON LA CALIDAD DEL BIODIESEL	72
3.2.1	Transesterificación de los lípidos obtenidos en la simulación en GAMS®	73
3.2.2	Esterificación de los ácidos grasos pertenecientes a la biomasa de <i>C. reinhardtii</i>	73
3.2.3	Caracterización de ésteres de metilo (FAME)	74
3.2.4	Predicción de las propiedades del Biodiesel	75
3.3	COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MODELO FBA CON DATOS EXPERIMENTALES PROPORCIONADOS POR GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE DISEÑO DE PRODUCTOS Y PROCESOS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	78
4.	CONCLUSIONES	82
5.	RECOMENDACIONES	84

BIBLIOGRAFÍA

85

ANEXOS

88

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Figura esquemática del Ciclo de Calvin	28
<b>Figura 2.</b> Representación gráfica de diferentes orgánulos de <i>Chlamydomonas</i>	30
<b>Figura 3.</b> Biosíntesis de lípidos microalgales	35
<b>Figura 4.</b> Esquema conceptual del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas.	39
<b>Figura 5.</b> Reacción general de transesterificación. R1, R2, R3 y R' son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas)	40
<b>Figura 6.</b> Esquema general del proceso de reconstrucción de una red metabólica	44
<b>Figura 7.</b> Proceso iterativo de integración de los experimentos de anotación de genes con la reconstrucción de la red metabólica y análisis	46
<b>Figura 8.</b> Comparación de red metabólica de <i>C. reinhardtii</i> en términos de anotación en la versión 3.0 JGI existente y la anotación de v3.1 JGI del modelo <i>iAM303</i> planteado	47
<b>Figura 9.</b> Vía de absorción de acetato de la anotación JGI existente incluyendo la nueva anotación CE	48
<b>Figura 10.</b> Gráfica porcentual de los resultados de las anotaciones de la red metabólica	48
<b>Figura 11.</b> Diagrama de reconstrucción genómica compartimentada de <i>C. reinhardtii</i>	50
<b>Figura 12.</b> Distribución de las transcripciones contabilizadas de la red categorizadas por su estado de verificación. Los códigos de color corresponden al porcentaje notable de transcripción y la secuencia verificada experimentalmente. Por ejemplo, el 42% de las transcripciones de la red se verificó experimentalmente mediante la secuencia de la cobertura del 100%	50
<b>Figura 13.</b> Diagrama vía VLCPUFA. Los nodos azules representan los metabolitos incluidos en <i>iRC1080</i> , y los nodos de color naranja representan metabolitos no incluidos en <i>iRC1080</i> y por ende que están ausentes en <i>C. reinhardtii</i>	51
<b>Figura 14.</b> Porcentajes de nuevos metabolitos añadidos a la red metabólica	54
<b>Figura 15.</b> Fases para la implementación del modelo FBA con la red metabólica de <i>C. reinhardtii</i> en GAMS®	56
<b>Figura 16.</b> Creación matriz estequiométrica	59
<b>Figura 17.</b> Diagrama general de ruta estratégica de asociación del perfil lipídico de <i>C. reinhardtii</i> con las propiedades del biodiesel	65
<b>Figura 18.</b> Influencia de la concentración de CO <sub>2</sub> en la producción de biomasa en el cultivo total (peso seco (g/L))	79

<b>Figura 19.</b> Influencia de la concentración de CO <sub>2</sub> en la Composición del extracto lipídico de <i>C. reinhardtii</i>	79
<b>Figura 20.</b> Influencia de la concentración de CO <sub>2</sub> en la Composición del extracto lipídico de <i>C. reinhardtii</i>	80

## LISTA DE CUADROS

	pág.
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de las principales clases de microalgas	25
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>C. reinhardtii</i>	29
<b>Cuadro 3.</b> Descripción de orgánulos de <i>C. reinhardtii</i>	31
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación tipos de cultivo de microalgas según fuentes de carbono y energía	31
<b>Cuadro 5.</b> Relación entre variables de cultivo y producción/acumulación de lípidos en microalgas	37
<b>Cuadro 6.</b> Genes sensibles al CO <sub>2</sub> resultantes del análisis FBA para la red complementada	52
<b>Cuadro 7.</b> Ésteres de metilo obtenidos después de la esterificación del ácido graso	74

## LISTA DE GRAFICOS

	pág.
<b>Gráfico 1.</b> Proporción de reacciones por compartimento celular	58
<b>Gráfico 2.</b> Proporción de metabolitos por compartimento celular	58
<b>Gráfico 3.</b> Ácidos grasos obtenidos de la transesterificación a diferentes valores de la relación C/N	73
<b>Gráfico 4.</b> Ésteres de metilo obtenidos por el modelo FBA a diferentes valores de la relación C/N	74
<b>Gráfico 5.</b> Viscosidad cinemática evaluada a diferentes valores de la relación C/N	75
<b>Gráfico 6.</b> Número de cetano evaluado a diferentes valores de la relación C/N	76
<b>Gráfico 7.</b> Punto de inflamación evaluado a diferentes valores de la relación C/N	77
<b>Gráfico 8.</b> Propiedades a baja temperatura, evaluadas a diferentes valores de la relación C/N	78
<b>Gráfico 9.</b> Proporción de FAMEs obtenidos de la programación del modelo FBA a 5% de CO <sub>2</sub>	80

## LISTA DE ECUACIONES

	pág.
<b>Ecuación 1.</b> Reacción general de procesos fotosintéticos	26
<b>Ecuación 2.</b> Reacción para la vía del carbono en la fotosíntesis	28
<b>Ecuación 3.</b> Coeficiente de variación de flux sensibles a cambios de CO <sub>2</sub>	53
<b>Ecuación 4.</b> Cinética de Monod	53
<b>Ecuación 5.</b> Función objetivo FBA	61
<b>Ecuación 6.</b> Ecuación de restricción de función objetivo	61
<b>Ecuación 7.</b> Reacciones que involucran el Nitrógeno y Carbono alimentado al cultivo de <i>C. reinhardtii</i>	62
<b>Ecuación 8.</b> Determinación del flux inicial de CO <sub>2</sub>	64
<b>Ecuación 9.</b> Determinación del flux inicial de Nitrógeno	64
<b>Ecuación 10.</b> Reacción general de transesterificación de triglicérido	66
<b>Ecuación 11.</b> Reacción general de esterificación ácido graso	66
<b>Ecuación 12.</b> Determinación del número de carbono del ácido graso obtenido de la transesterificación	66
<b>Ecuación 13.</b> Determinación del número de hidrógeno del ácido graso obtenido de la transesterificación	67
<b>Ecuación 14.</b> Determinación del número de oxígeno del ácido graso obtenido de la transesterificación	67
<b>Ecuación 15.</b> Determinación del número de carbono del éster de metilo obtenido de la esterificación	67
<b>Ecuación 16.</b> Determinación del número de hidrógeno del éster de metilo obtenido de la esterificación	67
<b>Ecuación 17.</b> Determinación de viscosidad cinemática, número de cetano o punto de inflamación	68
<b>Ecuación 18.</b> Determinación de propiedades a bajas temperaturas	69

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Requerimientos principales de los cultivos de microalgas	32
<b>Tabla 2.</b> Comparación de diferentes fuentes de biodiesel	38
<b>Tabla 3.</b> Principales ácidos grasos presentes en biodiesel producido de diferentes fuentes. Las composiciones se encuentran en wt%	41
<b>Tabla 4.</b> Cantidad de reacciones y metabolitos en el modelo iRC1080 y en la nueva red metabólica reconstruida	57
<b>Tabla 5.</b> Flux de carbono y nitrógeno ingresados a GAMS® para la simulación de la producción lipídica en <i>C. reinhardtii</i>	65
<b>Tabla 6.</b> Parámetros establecidos para el cálculo de propiedades del biodiesel	69
<b>Tabla 7.</b> Resultado de metabolitos y reacciones después de realizar la curación de la red metabólica reconstruida	70
<b>Tabla 8.</b> Resultados del valor de flux de la reacción biomasa en cada punto de C/N	70
<b>Tabla 9.</b> Lípidos resultantes en la simulación realizada en GAMS®	71

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexos A, B, C, D, E.</b> Ver CD	
<b>Anexo F.</b> Norma ASTM para Biodiesel D6751-09	89
<b>Anexo G.</b> Norma Europea para Biodiesel 14214-2008	90

## GLOSARIO

**ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO (FBA):** es un modelo matemático que se utiliza para estudiar los flux metabólicos encontrados en un sistema biológico en estado estacionario sin necesidad de conocer previamente las concentraciones iniciales, ni las cinéticas de reacción de los metabolitos relacionados con la red.

**BIODIESEL:** es un combustible compuesto por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos tales como aceites vegetales o grasas animales, y que se emplean en motores de ignición por compresión o motores diésel. Es un combustible definido como renovable, lo cual da cabida al uso del término biocombustible.

**BIOMASA:** materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

**BIOPROCESO:** es cualquier tipo de proceso que utiliza materia orgánica como la principal materia prima para transformarla en productos renovables y biodegradables útiles para otros procesos productivos.

**BIORREACTORES:** recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o proceso, ya sea con enzimas, microorganismos o con células vegetales y animales, viables y no viables.

**CROMATOGRAFÍA:** es una técnica de separación con aplicación directa principalmente a compuestos orgánicos y en algunos casos a compuestos inorgánicos. La separación cromatografía está fundamentada en el continuo y selectivo equilibrio de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil.

**LÍPIDOS:** químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad.

**MICROALGA:** microorganismos unicelulares y fotosintéticos, capaces de generar biomasa orgánica a partir de  $\text{CO}_2$  y luz usando agua como donador de electrones oxidándola a  $\text{O}_2$ . Se localizan en diversos hábitats tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes.

**PROGRAMACIÓN LINEAL:** es un método matemático utilizado en optimización para maximizar o minimizar una función objetivo, sujeta a un sistema de restricciones, donde todas las ecuaciones deben ser funciones lineales.

**TRANSESTERIFICACIÓN:** consiste en hacer reaccionar un lípido con un alcohol, preferiblemente de bajo peso molecular, para producir un éster y un subproducto, el glicerol. El proceso global se desarrolla en base a tres reacciones reversibles en la cuales se presentan como productos intermedios diglicéridos y monoglicéridos.

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se desarrolla una ruta estratégica que relaciona la proporción carbono nitrógeno (C/N) alimentado al cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* con la calidad del biodiesel. Como primera medida se inicia con la implementación del modelo matemático FBA en el software de programación de GAMS®, ingresando como condiciones iniciales 5% de CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y 4 puntos diferentes de nitrógeno, que al hacer un cálculo de proporción entre estos dos componentes, se encuentra que la mejor relación es al 4, 5, 7 y 9 de (C/N), para favorecer una mayor producción de lípidos en la biomasa microalgal. Luego con los resultados conseguidos a través de la simulación, se obtiene una caracterización de triglicéridos y ácidos grasos, que se llevan a una transesterificación y algunos a una esterificación para adquirir unos tipos de esteres de metilo que constituyen el biodiesel. Con la composición del biocombustible se procede a predecir 6 tipos de propiedades termofísicas por medio de correlaciones matemáticas para evaluar la calidad de su operatividad, dando como resultado una viscosidad cinemática entre el rango de 4-4,2 mm<sup>2</sup>/s, número de cetano entre 63-65, temperatura de inflamación entre 160-172°C y tres propiedades a baja temperatura (punto nube, punto de fluidez y punto de filtro frío) las cuales varían dependiendo del punto de relación que se evalúen, donde se encuentra que los valores de temperatura más bajas son en C/N=4 con un valor de 39 °C. Por último se realiza una comparación de los resultados del modelo FBA con datos experimentales obtenidos por el grupo de investigación de la Universidad de los Andes, donde se encuentra que 2 de los ácidos grasos caracterizados en la cromatografía realizada en la experimentación, también hacen parte del perfil lipídico obtenido por la simulación, dichos ácidos grasos corresponden al Ácido caprílico (C8:0) y Ácido palmítico (C16:0).

**Palabras clave:** Análisis de balance de flujo, relación carbono-nitrógeno, composición lipídica, *Chlamydomonas reinhardtii*, biomasa, transesterificación, biodiesel.

## INTRODUCCIÓN

La demanda energética que se presenta actualmente a nivel mundial y el aumento constante de la contaminación causada por el uso de energías convencionales, promueven la búsqueda de fuentes de energía no susceptibles a su agotamiento y que además no requieran para su producción grandes extensiones de tierra que pueden ser usadas para producción de alimentos o como materia prima en los procesos alimenticios; esta investigación se enfoca principalmente en la producción de biomasa y lípidos a partir de microalgas debido a que el desarrollo de nuevas fuentes de energía no convencionales plantea la implementación de tecnología que fomente el aprovechamiento de recursos renovables además de disminuir los riesgos que representan las fuentes de energía convencional para el medio ambiente.

El cultivo de microalga *Chlamydomonas reinhardtii* trae consigo beneficios para el medio ambiente, debido a su baja contaminación a la hora de realizar el medio de cultivo, para ello es de suma importancia el desarrollo de sistemas de cultivo que con un buen rendimiento y bajo costo generen resultados significativos en procesos biológicos como la producción de lípidos que a su vez se proyectaran en un futuro a la producción de biodiesel a partir de esta microalga. Esta producción de contenido lipídico requiere ciertas condiciones a las cuales se puede obtener de una forma más eficiente, además de los requerimientos a la hora de controlar parámetros para el crecimiento microalgal y por ende al aumento de producción de biomasa que a la larga serán productos aprovechables en la industria de biocombustibles, farmacéuticos o alimenticios.

El modelo de análisis de balance flujo estacionario (FBA) es un método que ha sido utilizado en el estudio de la bioquímica de diferentes microorganismos con el fin predecir el flux de metabolitos a través de una red metabólica.

El estudio de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* ha señalado que esta puede ser utilizada como un microorganismo modelo para comprender las capacidades de micro algas a nivel general y evaluar la viabilidad de fabricación de diferentes productos, uno de los más importantes, el biodiesel.

Este proyecto tiene como objetivo simular a través del FBA los efectos de diferentes concentraciones iniciales de  $N_2$  (al 0 mmol, 5,5 mmol, 7mmol, 8,3mmol, 10 mmol y 12,5 mmol) sobre la tasa de crecimiento microalgal y comparar los resultados con los datos experimentales obtenidos con anterioridad en el grupo de investigación de diseño de productos y procesos de la Universidad de los Andes.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una ruta estratégica que relacione la proporción carbono-nitrógeno (C/N) alimentado al cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* con la calidad del biodiesel.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Ajustar el modelo FBA para la obtención de la composición lipídica de la biomasa microalgal, incluyendo las nuevas reacciones metabólicas.
2. Generar una ruta estratégica que asocie la composición lipídica obtenida en el modelo FBA con el tipo de ésteres de alquilo del biodiesel.
3. Realizar una comparación de los resultados del modelo FBA, con los datos experimentales obtenidos por el grupo de investigación de Diseño de Productos y Procesos de la Universidad de los Andes.

## 1. GENERALIDADES

En este capítulo se presenta una extensión de los conceptos teóricos considerados fundamentales para la comprensión del texto. Aquí se encontraran, características, propiedades, ventajas y aplicaciones de las microalgas, además de una breve descripción de las condiciones de cultivo, propiedades del biodiesel y la reacción de transesterificación para la obtención de FAMES (Fatty Acid Methyl Ester). Adicional se podrán encontrar las definiciones de análisis de balance de flujo FBA y las nociones fundamentales para la reconstrucción genómica de la red metabólica de *C. reinhardtii*.

### 1.1 MICROALGAS

Las microalgas hacen parte de un diverso grupo de organismos protistas, eucariotas y unicelulares, capaces de obtener energía química mediante la transformación de energía luminosa con una eficiencia superior a la de las plantas. Son consideradas uno de los microorganismos más versátiles en términos de su tamaño, función y forma, además de estar catalogadas como productoras primarias de proteínas y lípidos en ambientes acuáticos. Dentro de sus características más importantes, se puede resaltar el gran potencial que poseen para ser fuente de productos bioquímicos en diferentes campos de la industria, tales como polisacáridos, lípidos y pigmentos, además de ser utilizada como fuente nutricional en suplementos elaborados en las industrias de alimentos y proveer materias primas para elaboración de medicamentos, fertilizantes y combustibles.

Es indispensable destacar que debido al proceso de fotosíntesis que llevan a cabo se han convertido en una parte imprescindible en diferentes ecosistemas, ya que son capaces de regular el contenido de oxígeno y dióxido de carbono en la atmosfera.

En cuanto a características de composición cabe aclarar los porcentajes que constituyen su biomasa, la cual se encuentra dividida de la siguiente manera: 20-30% de lípidos, 40-50% de proteínas y la parte restante se encuentra subdividida entre carbohidratos, que en algunas especies puede llegar hasta el 55% de la biomasa y otros compuestos de menor importancia<sup>1</sup>.

Las microalgas han sido catalogadas como la materia prima más eficiente para la producción de biomasa, además de ser reconocidas como un excelente recurso medioambiental y biotecnológico a nivel económico; así mismo se perfilan como una alternativa atractiva para su uso por numerosas razones<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Albarracín, I. (2007). MICROALGAS: POTENCIALES PRODUCTORAS DE BIODIESEL. Centro de Estudios Internacionales para el Desarrollo, pág. 1-16.

<sup>2</sup> Ibíd., pág. 3

- Alcanzan altos rendimientos solo con el uso de energía solar y una fuente de carbono como el CO<sub>2</sub>, por tanto su crecimiento en diferentes ambientes es sencillo debido a su capacidad fotosintética y a su requerimiento nutricional de fácil acceso.
- Cuando se realizan cultivos de microalgas a gran escala con sistemas abiertos resultan ser más simples y económicos, ya que se buscan construir básicamente estanques y cultivar cepas de microalgas que trabajen en condiciones extremas en las que otros organismos les resultaría difícil crecer, como por ejemplo pH altos o bajos, temperaturas y requerimientos nutritivos específicos, entre otros.<sup>3</sup>
- Es importante mencionar que las microalgas son aptas para ser cultivadas todo el año y cosechadas continuamente.
- Están capacitadas para sobrevivir y crecer en diversos ambientes que resultarían precarios para otro tipo de microorganismos, producción agrícola o consumo de seres humanos o animales. Dichos ambientes son: tierras marginales. Regiones áridas, ambientes salinos o hipersalinos de baja calidad, aguas residuales o cargadas de nutrientes<sup>4</sup>.
- Respecto al contenido lipídico de la microalga, se conoce que varía dependiendo de la especie y condiciones de cultivo tales como la temperatura, pH, tiempo de cultivo, intensidad lumínica entre otros. Además se sabe que el contenido de aceite en microalgas puede exceder el 80% de peso de biomasa seca los niveles del 20 al 50%<sup>5</sup> son un contenido bastante común.

Otros parámetros tales como morfología, estructura celular pigmentación y ciclo de vida, son factores que proporcionan una clasificación más generalizada de las diferentes especies de microalgas. En el Cuadro 1., se evidencia las diferentes clases y sus características considerando los parámetros anteriormente mencionados.

---

<sup>3</sup> González Céspedes, A. M. (Junio de 2016). CULTIVOS DE MICROALGAS A GRAN ESCALA: SISTEMAS DE PRODUCCIÓN. ADNagro (18), pág. 2.

<sup>4</sup> Derner, R. (2006, 12). Microalgas, productos y aplicaciones. Ciencia Rural, Vol. 36, pág. 1959-1967

<sup>5</sup> Albarracín, I. (2007). MICROALGAS: POTENCIALES PRODUCTORAS DE BIODIESEL. Centro de Estudios Internacionales para el Desarrollo, pág. 1-16

**Cuadro 1.** Clasificación de las principales clases de microalgas

<b>Clase</b>	<b>Características</b>
<b><i>Chlorophyta</i> (algas verdes)</b>	División conformada por una gran cantidad de especies, en particular por las que proliferan en ambientes dulceacuícolas. Pueden existir ya sea como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón, sin embargo pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones.
<b><i>Bacillariophyta</i> (diatomeas)</b>	Estas predominan en aguas oceánicas, no obstante también se les puede encontrar en aguas dulces y residuales. Se caracterizan por contener silicio en sus paredes celulares. Almacenan carbono de maneras diversas, ya sea como aceites o como crisolaminarina (polímero glúcido).
<b>Heterokontophyta</b>	División constituida por una gran diversidad de clases dentro de las cuales destaca la <i>Crysophyceae</i> (algas doradas), conformada por especies similares a las diatomeas en términos de composición bioquímica y contenido de pigmentos. Las especies de este grupo son principalmente de agua dulce. Sus reservas de carbono son los lípidos y carbohidratos.
<b>Cianobacterias</b>	Las cianobacterias son microorganismos procariotas cuya estructura y organización son similares a las de las bacterias. Las cianobacterias desempeñan un papel relevante en la fijación de nitrógeno atmosférico.

**Fuente:** Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 39- 40.

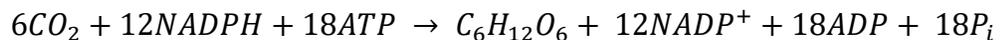
**1.1.1 Función fotosintética.** Los organismos fotoautótrofos son los que están capacitados para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis en el cual se sintetiza material orgánico mediante el uso de energía solar y materia inorgánica. El proceso fotosintético que realiza la microalga se encuentra dividido en dos grandes grupos de reacciones; las lumínicamente dependientes, cuya función principal es la captura de energía proveniente de la luz para transformarla en circulación energética de NADPH y ATP, cuyas reacciones promueven la transferencia y absorción de fotones que capturan esta energía para la posterior generación de un potencial químico. El segundo grupo de reacciones son entonces las independientes de la luz, en las cuales se involucran reacciones cuyo potencial químico es usado para fijar y reducir carbono inorgánico.

**1.1.2 Fijación fotosintética del CO<sub>2</sub>.** Las microalgas, como las cianobacterias y al igual también que las plantas verdes, emplean la energía de la luz del Sol para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el NADP<sup>+</sup> a NADPH.<sup>6</sup>

La fase independientemente lumínica es donde se da inicio al proceso de fijación de CO<sub>2</sub> usando el poder de asimilación de NADPH y ATP, eso sucede principalmente en los estromas que se encuentran en el cloroplasto cuando se tratan de microalgas eucariotas, en el caso contrario, en las procariotas, sucede en el citoplasma. Estas reacciones que conforman la fase independientemente lumínica de hecho no ocurren en un periodo de oscuridad, ocurren de manera simultánea con las reacciones lumínicas, con la única diferencia de que en su proceso no involucran la luz de forma directa. Estas reacciones independientes de la luz son asociadas al ciclo de Calvin Benson Bassham.

Puntualmente la fijación de dióxido de carbono tiene lugar en el estroma y se comienza con la ecuación de la reacción general, Ecuación 1., como en todas las ecuaciones de los procesos fotosintéticos.

**Ecuación 1.** Reacción general de procesos fotosintéticos



**Fuente:** Campbell, M. K. (2009). BIOQUÍMICA 6th ed. CENGAGE Learning.

La reacción neta de seis moléculas de dióxido de carbono para producir una molécula de glucosa requiere la carboxilación de un intermediario clave de seis moléculas con cinco átomos de carbono, la ribulosa-1,5-bisfosfato, para formar seis moléculas de un intermediario inestable de seis carbonos, que luego se divide para dar 12 moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PG). De ellas, dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PG) reaccionan a la vez y producen glucosa en último término.

Las 10 moléculas restantes de 3-fosfoglicerato (3-PG) se emplean para regenerar las seis moléculas de ribulosa-1,5-bisfosfato (Ru5P). La vía general de la reacción es cíclica y se refiere al Ciclo de Calvin.

Para entender en su totalidad la síntesis de carbohidratos a partir de la fijación de CO<sub>2</sub> es necesario dividir el ciclo de Calvin en tres etapas:

- Etapa I. Carboxilación: fijación de CO<sub>2</sub> en un intermedio orgánico estable.

---

<sup>6</sup> Martínez, A. R. (abril de 2011). Puesta en marcha de un cultivo de cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Riunet, pág. 1-102

- Etapa II. Reducción: reducción de este intermedio con el nivel de carbohidratos.
- Etapa III. Regeneración: regeneración del CO<sub>2</sub> aceptor.<sup>7</sup>

La primera reacción del Ciclo de Calvin es la carboxilación o condensación de la ribulosa-1,5-bisfosfato (Ru5P) con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para formar un intermedio de seis carbonos (2-carboxi-3-cetorribitol-1,5-bisfosfato) que rápidamente se hidroliza para dar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PG). La reacción es catalizada por la enzima *ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa* (RuBisCo). Esta enzima está ubicada sobre el lado del estroma de la membrana tilacoide.

Las dos reacciones siguientes conducen a la reducción de 3-fosfoglicerato (3-PG) para formar gliceraldehído-3-fosfato (G3P); las reacciones en los cloroplastos requieren de NADPH en vez de NADH para la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) a gliceraldehído-3-fosfato (G3P). El gliceraldehído-3-fosfato (G3P) formado puede tener dos destinos alternos: uno de ellos es la producción de azúcares de seis átomos de carbono y el otro la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP).<sup>8</sup>

En la última etapa se involucra una serie de reacciones que convierte la triosa-fosfato a cinco carbonos intermediarios de ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) la cual se requiere de ATP formado en las reacciones lumínicas. La triosa-fosfato formada en el Ciclo de Calvin puede permanecer en el cloroplasto donde este es convertido en almidón (starch); alternatively la triosa-fosfato puede ser exportada desde el cloroplasto donde es convertida a carbohidratos en el citoplasma en la cual se involucra la presencia de fosfato (Pi). En el caso de los carbohidratos, el fosfato debe ser retornado al cloroplasto para la continuación de la fosforilación.<sup>9</sup>

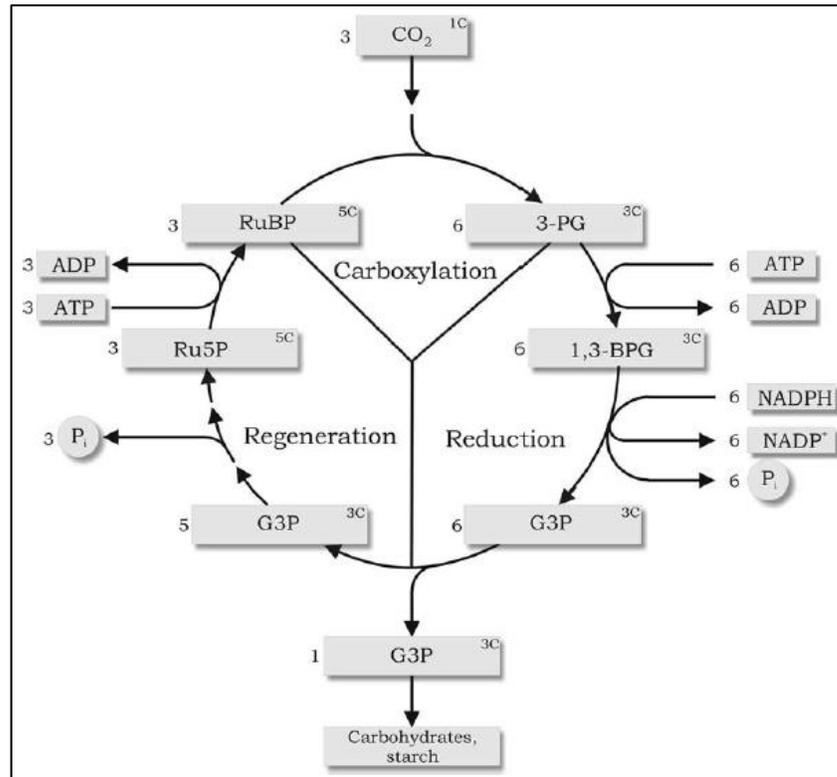
---

<sup>7</sup> Gualtieri, L. B. (2006). *Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis Group.

<sup>8</sup> CAMPBELL, M. K. y FARREL, S. O. *BIOQUÍMICA*. 6 ed. CENGAGE Learning, 2009.

<sup>9</sup> Gualtieri, L. B. (2006). *Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis Group.

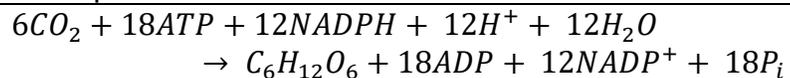
**Figura 1.** Figura esquemática del Ciclo de Calvin



**Fuente:** BARSANTI, L. y GUALTIERI, P. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. 2006. En: CRC. 'Press. TAYLOR & FRANCIS GROUP. pág. 251-288

Sin embargo todas las etapas y sus reacciones, para la síntesis de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) se pueden combinar en una reacción neta (Ecuación 2.) que resume el ciclo de Calvin (reacciones oscuras):

**Ecuación 2.** Reacción para la vía del carbono en la fotosíntesis



**Fuente:** Campbell, M. K. (2009). *BIOQUÍMICA* 6th ed. CENGAGE Learning.

## 1.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Es una microalga verde eucarionte (clorofita) de morfología ovoide de aproximadamente 10 micrómetros de largo por 3 de ancho, y en su extremo anterior posee dos flagelos responsables de su movilidad y reproducción sexual<sup>10</sup>. Esta microalga se encuentra en diferentes ambientes tales como suelos, aguas dulces, océanos, e incluso en la nieve<sup>11</sup>. Su espacio intracelular está ocupado en un 40% por un único cloroplasto el cual posee aproximadamente 80 copias de su genoma.<sup>12</sup> Son clasificadas como células haploides y entre sus características más importantes se encuentra que son capaces de crecer en un medio sencillo de sales inorgánicas usando la fotosíntesis para proporcionar energía.

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica de *C. reinhardtii*

<b>Reino</b>	Viridilantae
<b>Phylum</b>	Chlorophyta
<b>Clase</b>	Chlorophyceae
<b>Orden</b>	Volvocales
<b>Familia</b>	Chlamydomonadaceae
<b>Género</b>	Chlamydomonas
<b>Especie</b>	Chlamydomonas reinhardtii

**Fuente:** Nemose. (2008). *Chlamydomonas reinhardtii*. MetaMicrobe. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://www.metamicrobe.com/chlamy/#tax> (modificada por el autor)

### Morfología, reproducción y composición

- La microalga del género *Chlamydomonas* se caracteriza por ser una célula haploide y eucariota cuya reproducción consiste en un ciclo sexual controlado.
- Su aparato fotosintético está estrechamente relacionado con el de las plantas, el cual posee genes de fotosíntesis codificados por ambos de los genomas nucleares y de cloroplastos.

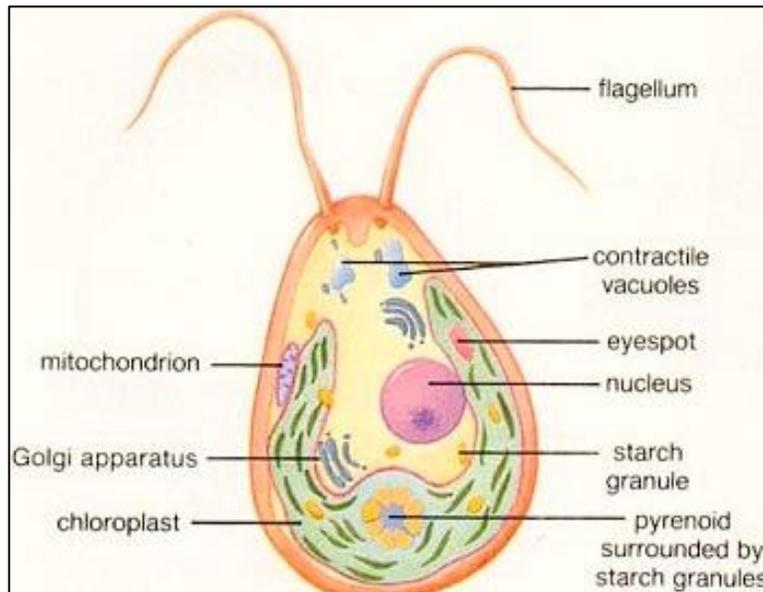
<sup>10</sup> Rivera Solís, R. A. (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. Revista Ciencia, pág. 2-9.

<sup>11</sup> *Ibid.*, pág. 3.

<sup>12</sup> *Ibid.*, pág. 3.

- Dentro de su estructura es de gran importancia mencionar que posee una pared celular y la capacidad de crecer heterotróficamente, lo cual permite el aislamiento de mutantes viables que son incapaces de realizar la fotosíntesis.
- Al igual que las células de esperma de animales, *Chlamydomonas* tiene un flagelo, que le permite llevar a cabo fototaxis, moviéndose hacia o lejos de la luz para maximizar la percepción de energía lumínica que requiere para realizar fotosíntesis o en el caso contrario minimizar el daño solar.
- Una de las características más interesantes que hacen a la microalga *Chlamydomonas* objeto de estudio, es que pueden adoptar un metabolismo anaeróbico, lo cual promueve la producción de gas de hidrógeno y metabolitos tales como formiato y etanol<sup>13</sup>.

**Figura 2.** Representación gráfica de diferentes orgánulos de *Chlamydomonas*



**Fuente:** *Biology Boom*. (Mayo de 2016). Type *Chlamydomonas* structure, Occurrence & reproduction. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://biologyboom.com/type-chlamydomonas-only-for-b-s/>

<sup>13</sup> Nemose. (2008). *Chlamydomonas reinhardtii*. MetaMicrobe. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://www.metamicrobe.com/chlamy/#tax> (modificada por el autor)

**Cuadro 3.** Descripción de orgánulos de *C. reinhardtii*

<b>Orgánulo</b>	<b>Características</b>
Flagelo (flagellum)	Se encuentran situados justo en la punta y se proyectan a través de una abertura en la pared o a través de dos canales separados.
Vacuolas contráctiles (contractile vacuoles)	Cada célula posee típicamente dos vacuolas contráctiles en la base de flagelos. Tienen funciones respiratorias y excretoras.
Mancha ocular (eyespot)	Es el fotoreceptor que permite detectar la dirección y la intensidad de la luz, por lo tanto dirige la fototaxis de la microalga.
Cloroplasto (chloroplast)	Es el orgánulo principal donde se producen todas las reacciones que dan origen a la fotosíntesis
Pirenoide (pyrenoid)	Se encuentra incrustado en el cloroplasto y básicamente consiste en un cuerpo proteico rodeado de numerosos y diminutos gránulos de almidón
Núcleo (nucleus)	Es un único núcleo que se encuentra en el citoplasma y contiene toda la información genética de la microalga.

### 1.3 CULTIVO DE MICROALGAS

Se define como cultivo a un ambiente creado artificialmente para proveer las condiciones de crecimiento necesarias para el crecimiento microalgal. Teóricamente se plantea que dichas condiciones de cultivo deben simular al ambiente natural dándole prioridad a las fuentes de energía, carbono y nitrógeno, las cuales van a establecer las diferentes formas de cultivar microalgas como se puede observar en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Clasificación tipos de cultivo de microalgas según fuentes de carbono y energía

<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Características</b>
Autotrófico	Utiliza luz natural o artificial, como fuente de energía y CO <sub>2</sub> como fuente de carbono
Heterotrófico	La energía y el carbono se obtienen de la oxidación de sustratos orgánicos. No todas las especies de microalgas pueden crecer en heterotrofia. Los costes de operación y riesgos de contaminación son elevados pero el control del proceso es máximo rindiendo elevadas productividades
Mixotrófico	Las microalgas realizan la fotosíntesis pero en presencia de una fuente de carbono orgánico

**Fuente:** Cubero, R. G. (2012). PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA ELIMINACIÓN FOTOSÍNTETICA DE CO<sub>2</sub>. Pág. 46.

## Factores que influyen en el crecimiento y producción de biomasa

Existen diferentes factores externos que generan un mayor impacto en el crecimiento y en la producción de biomasa tales como:

- Disponibilidad de nitrógeno
- Concentración de CO<sub>2</sub>
- Tasa de aireación
- Intensidad de la luz
- Temperatura
- pH
- proporción Carbono- Nitrógeno

Cuando se trata de elegir las condiciones adecuadas para realizar el medio de cultivo, no solo se debe tener presente que las células sobrevivan, sino además es necesario asegurar que se obtenga la mejor velocidad de crecimiento posible y el mejor rendimiento sujeto a los requerimientos que se quieran cumplir.

### 1.4 PARÁMETROS DE CULTIVO

En la Tabla 1., se muestran ciertos requerimientos necesarios y el rango de valor numérico en el que deberían estar para proporcionar las condiciones de cultivo más adecuadas para asemejar el ambiente natural.

**Tabla 1.** Requerimientos principales de los cultivos de microalgas

	Requerimientos	Compuestos químicos	Valores
<b>Físicos</b>	Luz		2,000 – 4,000 lux
	Temperatura		15 – 22°C
	Salinidad		0.37‰
	Ph		7 – 9
	Redox		
<b>Nutritivos</b>	C	CO <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ≈	g/100 ml
	O, H	O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	g/100 ml
	N	N <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> + NO <sub>3</sub>	g/100 ml
	P	PO <sub>4</sub> ≈	g/100 ml
	S	SO <sub>4</sub> ≈	g/100 ml
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 ml
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 ml
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al, et	Sales	µg/100 ml
	Vitaminas	B <sub>12</sub> , tiamina, biotina	µg/100 ml

**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

**1.4.1 Luz.** En las microalgas, al igual que en las plantas, la luz actúa como fuente principal de energía promoviendo las reacciones que llevan a cabo la fotosíntesis. En este parámetro es indispensable tener en cuenta la intensidad, calidad espectral y fotoperiodo para asegurar que el ciclo fotosintético se desarrolle de manera completa y adecuada.

**1.4.2 pH.** Existe un rango determinado de pH entre 7 y 9 para las mayorías de especies de algas, sin embargo se conoce que el rango óptimo se encuentra entre 8.2 y 8.7, sin embargo para mantener un pH aceptable cercano a este rango se recomienda airear el medio de cultivo.

**1.4.3 Nutrientes.** Las microalgas requieren diferentes tipos de macronutrientes que toman del medio del medio de cultivo. Por ejemplo entre los principales, encontramos el carbono inorgánico, cuya fuente principal generalmente es el CO<sub>2</sub>, el nitrógeno que se encuentra en nitratos, urea, amoníaco, etc., el fósforo, azufre, potasio, sodio, hierro, magnesio y calcio; de igual manera los micronutrientes tales como el boro, cobre, manganeso, molibdeno, zinc y vanadio son importantes en el crecimiento de las microalgas, y aunque se requieren en menor proporción cabe resaltar que son estrictamente necesarios debido a sus funciones metabólicas.

**1.4.4 Temperatura.** Este factor es considerado como el segundo más importante después de la luz, además de ser una fuerte limitante en sistemas de cultivos cerrados y abiertos. Según reportes de los efectos que tienen la temperatura en diferentes especies, las microalgas pueden llegar a tolerar temperaturas de hasta 15 °C.<sup>14</sup>

**1.4.5 Salinidad.** Cada especie de algas posee un rango óptimo de salinidad que puede aumentar durante condiciones de temperatura elevadas, además de afectar la composición celular y el crecimiento. Dicha elevación de temperatura genera una alta evaporación del medio de cultivo ya sea en sistemas abiertos o cerrados, que a su vez da la oportunidad de obtener un mayor control de la salinidad mediante la adición de agua dulce o salada dependiendo de la necesidad.

---

<sup>14</sup> Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *ELSEVIER*, pág. 217-232.

**1.4.6 Agitación.** El objetivo principal de la agitación es lograr una mejor distribución de las células, el calor, los metabolitos y facilitar la transferencia de gases a través de la homogenización del medio de cultivo, por tal motivo este parámetro es considerado como uno de los más importantes a llevar a cabo las preparaciones adecuadas de los sistemas de crecimiento, además el grado de turbulencia que genera una buena agitación permite que la circulación de las células de microalgas de la oscuridad a la luz sea aún más rápida, sin embargo dicha agitación genera burbujas que por medio de las fuerzas de cizallamiento pueden causar daño a las células.

## **1.5 CONTENIDO LIPÍDICO DE MICROALGAS**

Existen diferentes tipos de microalgas con altas productividades lipídicas que las hacen deseables para obtención de biodiesel, por tal motivo la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa microalgal y la velocidad de crecimiento se convierten en parámetros claves a la hora de seleccionar la especie de microalgal a trabajar, debido a que el contenido lipídico será considerado de dicha especie y no del género. Esta característica hace posible la clasificación de las microalgas oleaginosas eucariotas en diversos grupos como clorofitas, diatomeas, crisofitas, haptófitas, xantófitas, entre otras, de allí se genera una selección de tres grandes grupos de lípidos: glicéridos, fosfolípidos y esteroides, compuestos que se caracterizan por ser insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos. Los glicéridos son ésteres de ácidos grasos de glicerina que constituyen el contingente mayoritario de los lípidos de reserva energética; la glicerina presenta tres grupos alcoholílicos que al ser esterificados da lugar a los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos.<sup>15</sup>

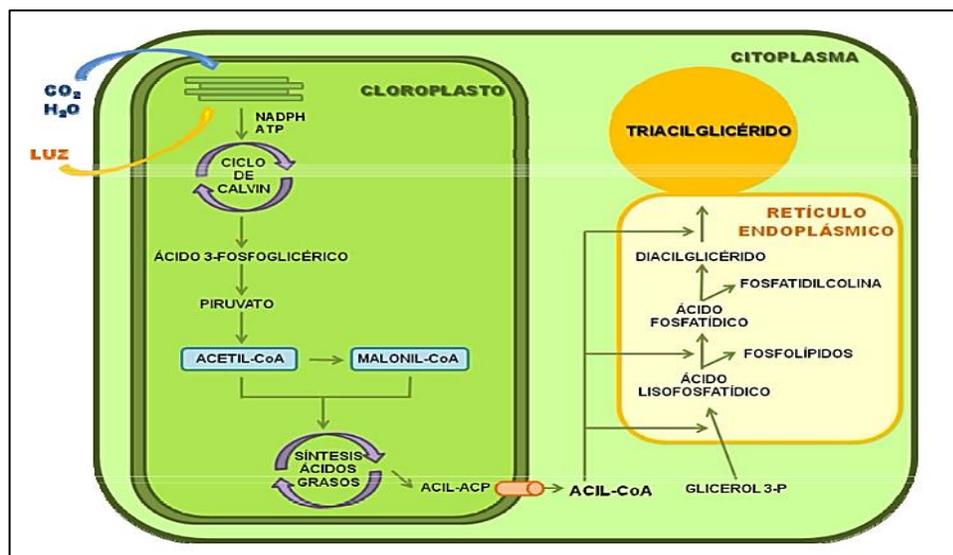
---

<sup>15</sup> Leislly Dariana Galindo Vega, S. S. (2010). Adaptación del método de extracción Bligh y Dyer a la extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de biodiesel.

**1.5.1 Síntesis de lípidos.** El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis de novo de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y  $\beta$ -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas.

Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 $\omega$ 9) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación. Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la defosforilación del ácido fosfatídico previamente formado<sup>16</sup>. En la Figura. 3, se presenta un esquema que describe en términos generales la biosíntesis de lípidos microalgales.

**Figura 3.** Biosíntesis de lípidos microalgales



**Fuente:** Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 50.

<sup>16</sup> Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 49

**1.5.2 Condiciones ambientales que afectan la acumulación de lípidos.** Si bien se ha dicho que la producción y la composición lipídica de las microalgas dependen principalmente de la especie y en últimas de la constitución genética, existen diversos factores ambientales que la afectan. Dichos factores pueden ser de índole físico o químico tales como:

- Clase de nutrientes y su disponibilidad
- Salinidad
- Fotoperiodos
- pH
- temperatura
- asociación con otros microorganismos.

Del primer factor, se puede decir que la restricción de nutrientes obliga a la microalga a entrar en una fase de climatización que se evidencia en cambios morfológicos, cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos.

La limitación de Nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación. Respuestas similares son inducidas por la deficiencia de fósforo, azufre y silicio, siendo el efecto de este último específico para las diatomeas<sup>17</sup>.

Por otra parte la fijación continua de carbono, promueve la acumulación de lípidos en especies oleaginosas y orienta la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos bajo tales circunstancias, fungen como una reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo contra el estrés fotooxidativo<sup>18</sup>.

En cuanto a las consecuencias de la temperatura e intensidad lumínica sobre el perfil lipídico de las microalgas, se conoce que el grado de insaturación presenta un incremento a bajas temperaturas y que además la acumulación de triglicéridos con un perfil elevado de saturación se ve sustancialmente favorecida cuando se maneja altas intensidades luminosas y en el caso contrario, bajas intensidades luminosas, se presenta la síntesis de lípidos polares altamente insaturados, estructural y funcionalmente asociados con las membranas.

En el cuadro 5., se puede evidenciar la relación entre las variables de cultivo y la síntesis de lípidos en microalgas.

---

<sup>17</sup> Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 51.

<sup>18</sup> Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 51.

**Cuadro 5.** Relación entre variables de cultivo y producción/acumulación de lípidos en microalgas

Variable	Relación
Nitrógeno	Bajo condiciones de escasez de nitrógeno, se detiene la producción de proteínas y se amplifica la acumulación de lípidos.
Carbono inorgánico	A condiciones de bajo CO <sub>2</sub> se cohibe la fotosíntesis, afectando la producción de lípidos y carbohidratos.
Iluminación	A baja densidad de flujo de fotones (PFD: photon flux density) disminuye la capacidad de captación de carbono ya que se inhibe parcialmente la fotosíntesis. Condiciones de alto PFD se satura la tasa fotosintética.
Ph	El equilibrio CO <sub>2</sub> – HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> se puede ver afectado con altas variaciones del pH, acidificando el medio e inhibiendo procesos celulares como la asimilación de nutrientes y disminuyendo la velocidad de crecimiento, afectando de igual forma la biosíntesis y acumulación de lípidos en el cloroplasto.
Temperatura	A bajas temperaturas se disminuye la velocidad del metabolismo de la célula, afectando la producción de lípidos.
Proporción C:N	Una proporción alta de C:N favorece la acumulación de lípidos.

**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

**1.5.3 Ácidos grasos en microalgas.** Los ácidos grasos son los componentes comunes de los triglicéridos y de los fosfolípidos, dichos ácidos se dividen en dos grandes grupos, los saturados y los insaturados. El primero grupo, los saturados, se caracterizan por ser sólidos a temperatura ambiente que además se encuentran en alimentos de origen animal. Los ácidos grasos insaturados o también conocidos como “aceites”, son líquidos a condiciones ambientales y se encuentran en productos de origen vegetal.

Los ácidos grasos en las microalgas se encuentran principalmente en sus membranas y sus fuentes de reserva, la mayor parte de ellos son poliinsaturados que poseen composiciones similares a los de los demás aceites vegetales.

Se sabe que el contenido lipídico varía dependiendo de la especie de microalga y que además, se tienen reportes de que algunas especies terrestres contienen fracciones lipídicas de hasta el 80% en peso de base seca. El aceite de microalga

contiene en su mayoría ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, por lo cual el 64% en peso de ácidos grasos totales serán insaturados.<sup>19</sup>

## 1.6 BIODIESEL

El biodiesel es un biocombustible líquido que consiste en monoalquil-ésteres de alcoholes de cadena corta, usualmente etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable y que es técnicamente capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo como combustible. En contraste con el petrodiesel, el biodiesel ofrece varias ventajas ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (se degrada cuatro veces más rápido que el diesel fósil) y produce menos emisiones indeseables (CO, hidrocarburos aromáticos policíclicos, partículas de hollín, óxidos de azufre y nitrógeno, metales) durante su combustión a causa de su estado oxigenado, siendo éstas por ende menos nocivas. Además, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y es un material seguro para su transporte, almacenamiento y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (100 - 170°C).<sup>20</sup>

Las principales fuentes de biodiesel se encuentran relacionadas en la Tabla 2., se puede notar que la mayoría también son fuente de alimento, por lo cual se plantean nuevas alternativas, entre ellas la producción de biodiesel a partir de microalgas.

**Tabla 2.** Comparación de diferentes fuentes de biodiesel

Cultivo	Rendimiento de aceite (L/ha)	Área de tierra necesaria (M ha) <sup>a</sup>	Porcentaje de área para el cultivo en USA <sup>a</sup>
Maíz	172	1540	846
Soya	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma de aceite	5950	45	24
Microalgas <sup>b</sup>	136900	2	1.1
Microalgas <sup>c</sup>	58700	4.5	2.5

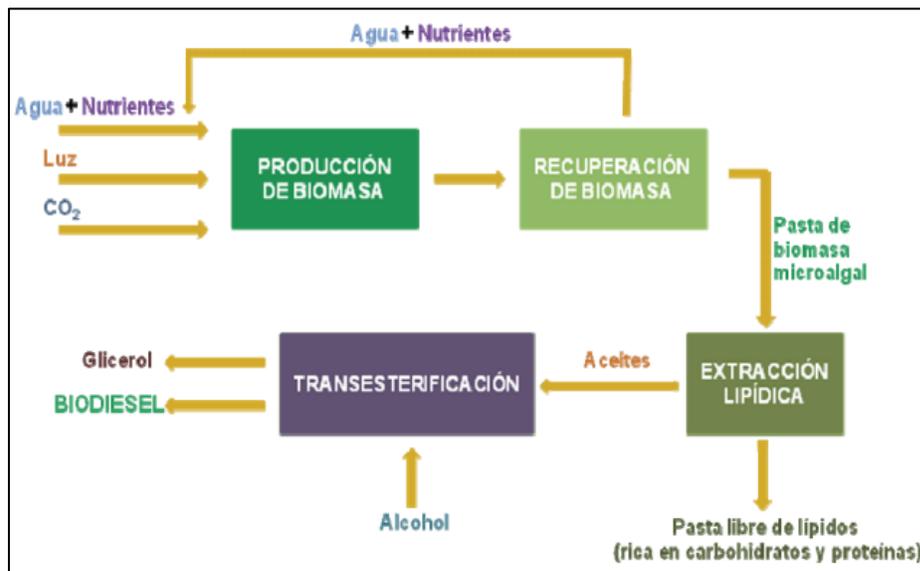
**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

<sup>19</sup> Singh Nigam, P., & Singh, A. (ENERO de 2010). Production of liquid biofuels from renewable resources. *ELSEVIER*, pág. 5.

<sup>20</sup> Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *Bio Tecnología*, pág. 39

**1.6.1 Producción de biodiesel a partir de microalgas.** La producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado, en términos generales, por las etapas elementales de producción de biomasa rica en lípidos, recuperación o cosecha de la biomasa, extracción de lípidos y transesterificación<sup>21</sup>.

**Figura 4.** Esquema conceptual del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas.



**Fuente:** Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 52.

**1.6.2 Transesterificación.** Existen diferentes métodos usados para producción de biodiesel diferenciados entre sí por factores como la materia prima, equipos, reacciones y condiciones de operación. De estas diferentes metodologías, son cuatro las que han sido objeto de exhaustivas investigaciones: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diesel fósil, microemulsiones, pirolisis y transesterificación<sup>22</sup>. La aplicación de los tres primeros métodos no son lo suficientemente satisfactorios para motores diésel debido a que causan problemas de obstrucción en los inyectores, formación de depósitos de carbono, combustión incompleta, daño del lubricante y en el caso de la pirolisis, la eliminación de beneficios ambientales inherentes al uso de combustibles oxigenados.

La transesterificación (Figura 5) es una reacción química que ocurre entre los aceites, más específicamente triglicéridos y un alcohol que puede ser metanol,

<sup>21</sup> Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 52

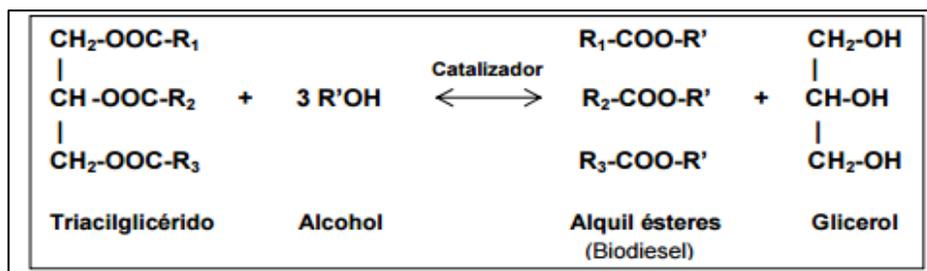
<sup>22</sup> A. Jaime-Infante, Z. H.-D. (2014). IHERRAMIENDA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS EN UN SISTEMA BIOLÓGICO. *Revista investigacional operaciona*, pág. 96-103.

etanol, propanol o butanol. En dicha reacción se obtienen glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos, los cuales se conocen también como biodiesel.

Teniendo en cuenta los tipos de triglicéridos producidos por la microalga y sus correspondientes cantidades, es factible determinar el tipo de biodiesel que se podría producir a través de un proceso de transesterificación y además determinar las propiedades del mismo tales como viscosidad cinemática, número de cetano y punto de inflamación.

Es indispensable tener presente que la producción de diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos depende de la especie a trabajar y que además no cualquier lípido sirve para producir biodiesel, de allí surge la necesidad de la correcta caracterización de los lípidos producidos por *C. reinhardtii* que además proporciona el conocimiento acerca de factibilidad de cultivarlas con el fin de que sean fuente de materia prima para la elaboración del biocombustible.

**Figura 5.** Reacción general de transesterificación. R1, R2, R3 y R' son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas)



**Fuente:** Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Bio Tecnología, pág. 40.

**1.6.3 Esteres de metilo (FAME).** Los esterres de metilo, o también conocidos como FAMES, por su nombre en inglés fatty acid methyl esters, no son más que el compuesto de interés producido por la reacción de transesterificación. Son la unidad básica de los ácidos grasos y se pueden obtener en diferentes fracciones dependiendo del tipo de materias primas.

En la tabla 3 se pueden ver los FAME presentes en biodiesel obtenido de diferentes fuentes vegetales. Existe una tendencia clara en las composiciones y es que en la mayor parte de los biodiesel obtenidos predominan los FAME de 16 (saturados) y de 18 (saturados e insaturados) carbonos. Al mismo tiempo, estas composiciones se encuentran correlacionadas a un indicador importante en el biodiesel llamado número de cetano, el cual indica la velocidad de combustión del

diesel; a mayor número de cetano, de mejor calidad es la combustión ya que transcurre un tiempo menor entre la inyección del combustible y su ignición.<sup>23</sup>

La determinación de la composición de los tipos de FAME que contiene una potencial fuente de grasa, resulta de suma importancia para la producción de un biocombustible de buena calidad.

**Tabla 3.** Principales ácidos grasos presentes en biodiesel producido de diferentes fuentes. Las composiciones se encuentran en wt%

Biodiesel	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 w9	C18:2 w6	C18:3 w3	Otros
Soya	0,1	0,1	10,2	3,7	22,8	53,7	8,6	0,8
Caucho	0,0	0,2	12,5	8,3	27,8	37,7	13,4	0,1
Algodón	0,1	1,0	20,1	2,6	19,2	55,2	0,6	1,2
Jatropha	0,0	0,1	15,6	10,5	42,1	30,9	0,2	0,6
Girasol	0,2	0,8	38,6	4,6	44	10,7	0,1	1,0
Palma	0,2	0,8	39,5	5,1	43,1	10,4	0,1	0,8
Coco	45,6	22,1	10,2	3,6	8,2	2,7	0,0	7,6

**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.<sup>24</sup>

## 1.7 PROPIEDADES DEL BODIESEL

Existen ciertas propiedades fisicoquímicas que establecen los usos y la calidad del biocombustible. A continuación se mencionan las que serán evaluadas en el desarrollo de esta investigación.

**1.7.1 Viscosidad cinemática.** La viscosidad es una magnitud física que mide la resistencia interna al flujo de un fluido, resistencia producto del frotamiento de las moléculas que se deslizan unas contra otras.<sup>25</sup> La viscosidad cinemática relaciona la viscosidad dinámica o absoluta con la densidad del fluido utilizado, las unidades más utilizadas son los centistokes (mm<sup>2</sup>/s).<sup>26</sup> Para las propiedades del biodiesel,

<sup>23</sup> ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

<sup>24</sup> ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

<sup>25</sup> García, Y. (2014). Viscosidad. *conceptodefinicion.de*. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://conceptodefinicion.de/viscosidad/>

<sup>26</sup> Ramírez Navas J.S. (2006). INTRODUCCIÓN A LA REOLOGÍA DE ALIMENTOS. ReCiTeIA. Pág 1- 45.

se busca cumplir la norma ASTM 6751, donde se opera la viscosidad cinemática a 40°C.

**1.7.2 Número de cetano.** Es el índice convencional de la mayor o menor inflamabilidad de un gas-oil para motores de combustión interna, tipo Diesel.<sup>27</sup> Es importante para el biodiesel ya que indica la calidad de ignición del combustible diesel y afecta al rendimiento del sistema de motor.

**1.7.3 Punto de inflamación.** Es la temperatura a partir de la cual una mezcla de vapores de una sustancia inflamable y aire puede salir incinerando en contacto con una fuente de ignición.<sup>28</sup> La temperatura puede estar por encima o debajo de la temperatura ambiente.

**1.7.4 Propiedades de flujo a baja temperatura.** El biodiesel presenta una serie de ventajas sobre el diesel de petróleo, tales como la mejora de la lubricidad, toxicidad reducida, una mayor biodegradabilidad, las emisiones más bajas, y más alto punto de inflamación. Sin embargo, las propiedades de flujo a baja temperatura pobres limitan la aplicación de biodiesel.<sup>29</sup>

La formación de precipitados en biodiesel a bajas temperaturas puede causar efectos graves en los sistemas de suministro de combustible diesel. Industria utiliza típicamente tres índices para caracterizar las propiedades en frío de temperatura de los combustibles diesel: (1) punto de enturbiamiento (CP), la temperatura a la que los cristales de cera disueltos primero forman un aspecto turbio en la fase líquida cuando se enfría en condiciones controladas; (2) punto de fluidez (PP), la temperatura a la que el combustible ya no puede verter o fluir debido a la formación de gel; y el punto (3) del filtro en frío de enchufar (CFPP), la temperatura a la que los bloques de combustible diesel del dispositivo de filtro como resultado de la formación de aglomerados cristalinos.

## 1.8 MODELAMIENTO DE REDES GENÓMICAS

La reconstrucción y simulación de redes metabólicas, consiste en dividir las diferentes vías metabólicas que componen a la red en sus correspondientes reacciones y enzimas, con el fin de obtener una visión más detallada de los mecanismos moleculares de un organismo específico, y conseguir una perspectiva

---

<sup>27</sup> MOTORGIGA. (s.f.). (Cetano) Numero de. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <https://diccionario.motorgiga.com/diccionario/cetano-numero-de-definicion-significado/gmx-niv15-con193496.htm>

<sup>28</sup> *Salud y Riesgos*. (s.f.). Punto de inflamación. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://www.saludyriesgos.com/-/punto+de+inflamacion>

<sup>29</sup> Yung-Chieh Su, Y. L. (2011). Selection of Prediction Methods for Thermophysical Properties for Thermophysical Properties for Process Modeling and Product Design of Biodiesel Manufacturing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, pág. 6809-6836.

de un red entera que logre reunir toda la información genética relevante compilada en un modelo matemático que permitirá correlacionar el genoma con la fisiología molecular.

Los modelos metabólicos de escala genómica, son la integración de las rutas metabólicas bioquímicas con las secuencias del genoma que no han sido registradas, de allí se entiende que a mayor disponibilidad de la información sobre la fisiología, bioquímica y genética de un organismo, mejor será la capacidad de predicción de los modelos que se han logrado reconstruir.

Una reconstrucción está basada en la compilación de antecedentes de diferentes bases de datos como KEGG y BioCyc, de donde se pueden extraer los diferentes genes metabólicos del organismo de interés. Estos genes serán contrastados con los diferentes organismos genética o morfológicamente relacionados de los cuales ya han sido desarrolladas reconstrucciones para así encontrar genes homólogos y sus reacciones que puedan alimentar el nuevo proyecto de reconstrucción.

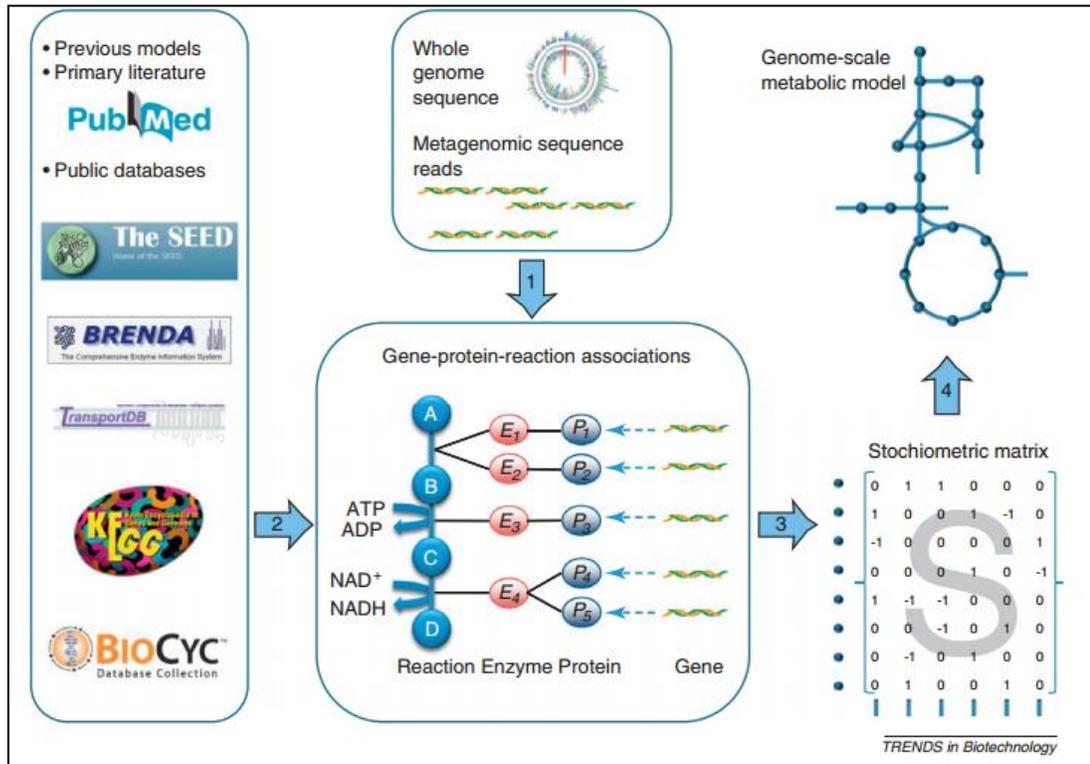
La comparación con sistemas biológicos ya reconstruidos, tiene como objetivo el refinamiento de la nueva reconstrucción de red, de allí que cualquiera de las nuevas reacciones que no esté presente en las bases de datos debe ser añadida a la reconstrucción. Este es un proceso interactivo que ronda entre la fase experimental y la de codificación. Debido a que se encuentra nueva información sobre el organismo objetivo, el modelo se ajustara para predecir la salida fenotípica y metabólica de la célula. La presencia o ausencia de ciertas reacciones del metabolismo afectaran a la cantidad de reactivos/productos que están presentes para otras reacciones dentro de una vía en particular, esto se debe a que los productos de una reacción se convertirán en los reactivos de otra, es decir, productos de una reacción pueden combinarse con otras proteínas o compuestos para formar nuevas proteínas/compuestos en presencia de diferentes enzimas o catalizadores.<sup>30</sup>

Lo siguiente a implementar, es lo referente a la simulación, y es allí cuando se define el modelo matemático que usualmente es aplicar un análisis de balance de flujo (FBA), cuyo propósito es evaluar el comportamiento de la red metabólica mediante una programación lineal que se usa para obtener el máximo potencial de la función objetivo que usualmente es referida al flux de biomasa, y por lo tanto encontrar una única solución al problema de optimización. A continuación se presenta un esquema general (Figura 6), donde se resumen el proceso de reconstrucción de una red metabólica.

---

<sup>30</sup> C., F., RJ, S., & B., T. (2005). Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. *Trens in Microbiology*, 13, pág. 550-558.

**Figura 6.** Esquema general del proceso de reconstrucción de una red metabólica



**Fuente:** Karlsson, Nookaew, Petranovic. (2011). Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome.

El esquema inicia teniendo Información general sobre el genoma del sistema biológico a estudiar, luego se utiliza como referentes la reconstrucción genómica realizada anteriormente a comunidades microbianas homologas (flecha 1). Los modelos anteriores, y las bases de datos públicas se utilizan para recopilar información genómica y metabólica, que a su vez facilita el montaje de las asociaciones gen-proteína-reacción, reconstrucción por lo general comienza con una secuencia de comparación con los modelos y bases de datos anteriores, luego el modelo generado se somete a una curación manual con la ayuda de la información de diferentes modelos ya realizados (flecha 2). Las reacciones metabólicas que describen el sistema biológico trabajado, se formulan en una representación matemática correspondiente a una matriz estequiométrica (flecha 3). La matriz estequiométrica, junto con la información sobre los genes, las proteínas, metabolitos, y reacciones, se ensamblan en un modelo metabólico a escala genómica integral (flecha 4).<sup>31</sup>

<sup>31</sup> Karlsson, Nookaew, Petranovic. (2011). Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome.

**1.8.2 Modelo *iAM303*. Análisis de redes metabólicas integrados con transcripción de genes secuenciados.** En septiembre de 2009 se publica un artículo en el cual se describe la investigación desarrollada por Roger L Chang y Jason A Papain, donde se establece un modelo de reconstrucción de red metabólica (*iAM303*) para *C. reinhardtii* basado en sistemas de verificación de la enzima que codifica marcos de lectura abierta (secuencia comprendida entre un codón de inicio de la traducción y un codón de terminación) haciendo una labor predictiva y cuantitativa asociada con dichos marcos de lectura abiertos que han sido clonados.

Dada la estrecha relación entre la anotación de genes y reconstrucción de una red metabólica, este modelo propone una metodología iterativa, cuyo objetivo es la integración de la verificación experimental de transcripción con el modelado computacional de escala del genómica (Figura 7).

Una red metabólica inicial, generada a partir de fuentes bibliográficas y con el uso de la bioinformática, sirve para identificar los genes de *C. reinhardtii* que luego se validan experimentalmente realizando PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) para verificar la existencia de las transcripciones hipotéticos y para perfeccionar las anotaciones estructurales<sup>32</sup>.

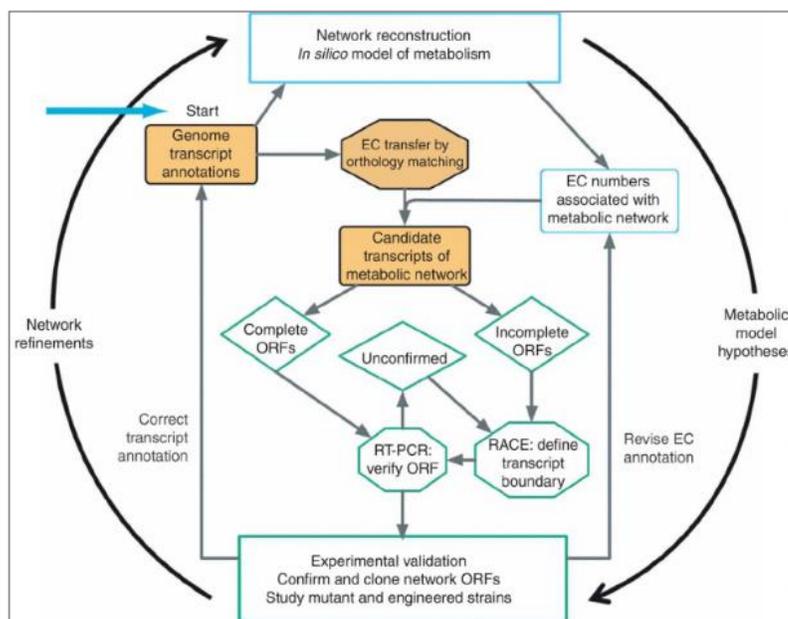
En esta investigación Utilizaron los resultados de los experimentos de verificación transcripción para refinar el modelo metabólico, con especial atención a la eliminación de reacciones asociadas con las transcripciones no verificadas experimentalmente.

Dentro de los resultados, se obtiene que el modelo *iAM303*, es un modelo mucho más completo que además proporciona las vías para realizar nuevas actualizaciones y modificaciones que conducirán a una nueva ronda de verificación de la transcripción y modelización de la red, demás pone en evidencia que el refinamiento iterativo continúa hasta que la red y sus genes asociados sean totalmente desarrollados y validados.

---

<sup>32</sup> Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. ResearchGate, pág. 1-9.

**Figura 7.** Proceso iterativo de integración de los experimentos de anotación de genes con la reconstrucción de la red metabólica y análisis



**Fuente:** Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 6.

Uno de los puntos clave para iniciar el proceso iterativo, fue la generación de nuevas anotaciones asignando números a las comisiones de enzimas (CE) por comparación de herramientas de búsqueda de alineamiento local (BLAST) en secuencia básica de transcripciones, lo cual dio la posibilidad de incluir términos de la CE que hacían falta en la anotación de la secuencia genómica funcional de *Chlamydomonas reinhardtii* ya existente (Joint Genome Institute JGI), produciendo así diferencias funcionales en las vías metabólicas.<sup>33</sup>

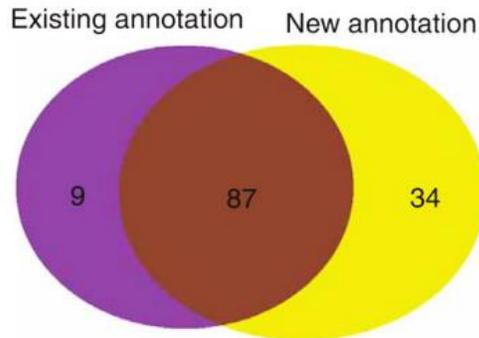
Un ejemplo claro del resultado de las actualizaciones realizadas a las anotaciones JGI fue la adición de seis términos CE utilizados para la producción de triacilglicerol<sup>34</sup>, un glicérido de interés para los propósitos de producción de biocombustibles y que ahora se puede encontrar en el modelo actualizado. En la Figura 8., se puede notar el resultado de la comparación entre el número de

<sup>33</sup> Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 7.

<sup>34</sup> Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 2.

términos de CE de la anotación JGI existente y el número de términos CE que adiciona la anotación propuesta por los investigadores.

**Figura 8.** Comparación de red metabólica de *C. reinhardtii* en términos de anotación en la versión 3.0 JGI existente y la anotación de v3.1 JGI del modelo *iAM303* planteado



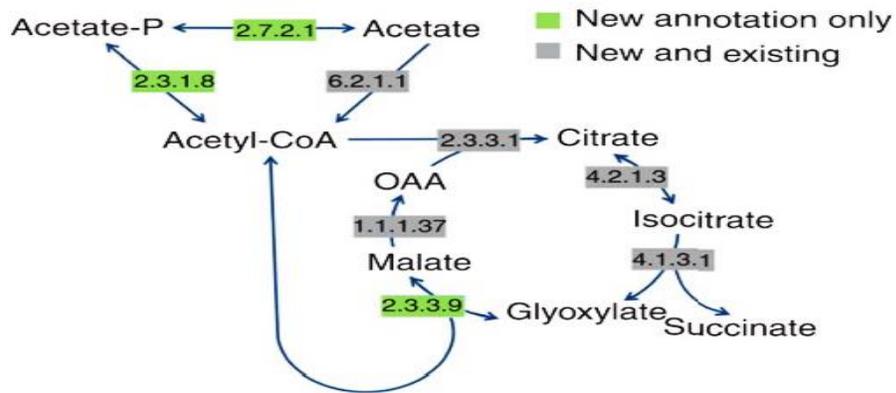
**Fuente:** Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 7.

La aplicación de estas dos versiones de anotación CE para informar a la red de reconstrucción produjo diferencias funcionales en las rutas metabólicas centrales, este hecho se ilustra en las vías de absorción de acetato inferidas a partir de los dos conjuntos de anotación (Figura 9)<sup>35</sup>. Teniendo en cuenta que el acetato es la única fuente de carbono utilizada por *C. reinhardtii* de tipo salvaje, las diferencias se traducen directamente a la vía de fenotipos de crecimiento medible.

---

<sup>35</sup> Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 7.

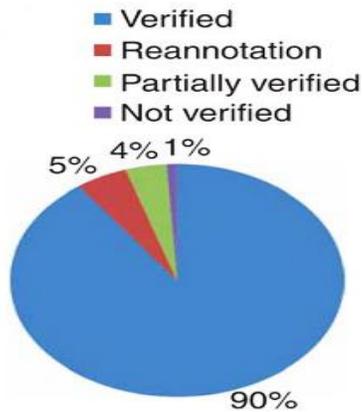
**Figura 9.** Vía de absorción de acetato de la anotación JGI existente incluyendo la nueva anotación CE



**Fuente:** Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 7.

En la Figura 10 se presenta un resumen de los resultados de la verificación y anotación estructural de las transcripciones metabólicas centrales *C. reinhardtii* verificada mediante los métodos RT-PCR y RACE.<sup>36</sup>

**Figura 10.** Gráfica porcentual de los resultados de las anotaciones de la red metabólica



Fuente: Ani Manichaikul, L. G. (2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág. 7.

<sup>36</sup> *Ibíd.*, pág. 7.

En la ilustración anterior, el concepto de parcialmente verificado (partially verified) denota los casos en los que el marco abierto de lectura ensamblado no coincide completamente con la secuencia del genoma, o una secuencia completa no podía ser montada.

**1.8.3 Reconstrucción genómica iRC1080 de *Chlamydomonas reinhardtii*.** En agosto de 2011 se publicó un artículo que vale la pena mencionar puesto que el aporte fue de suma importancia para llevar a cabo el desarrollo de este proyecto, debido a que el objetivo principal del desarrollo de Chang *et al.* (principal autor del artículo) fue la reconstrucción de la red metabólica de *C. reinhardtii* bajo diferentes longitudes de ondas de luz cuyos resultados fueron validados experimentalmente.

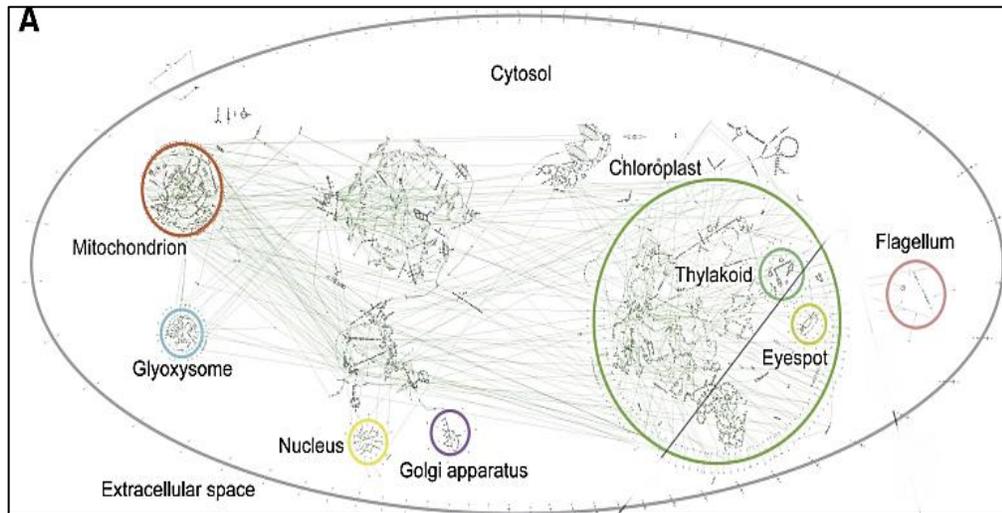
El modelo iRC1080 fue la primera red desarrollada que tuvo en cuenta la absorción detallada de fotones que permite simulaciones de crecimiento bajo diferentes fuentes de luz. Esta red representa 1080 genes, asociados con 2190 reacciones y 1068 metabolitos únicos, además abarca 83 subsistemas distribuidos a través de 10 compartimientos celulares.

La red iRC1080 se utilizó para analizar el metabolismo lipídico y generar nuevas hipótesis sobre rutas de lípidos de *C. reinhardtii*, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

iRC1080 proporciona un recurso para estudiar a fondo los compartimientos celulares y cada una de las rutas metabólicas que se dan en estos además de evidenciar otros productos metabólicos y una base para el diseño de ingeniería genética de la cepa.

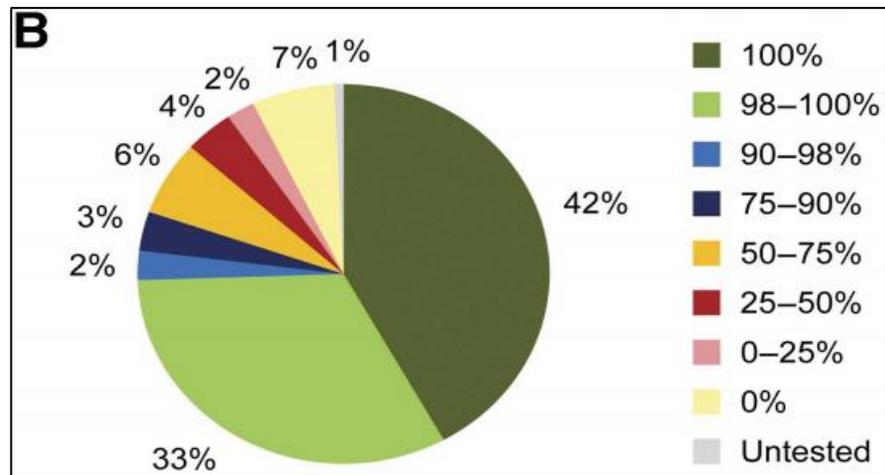
Los resultados finales de la reconstrucción genómica de la red iRC1080 se pueden evidenciar en las siguientes ilustraciones.

**Figura 11.** Diagrama de reconstrucción genómica compartimentada de *C. reinhardtii*



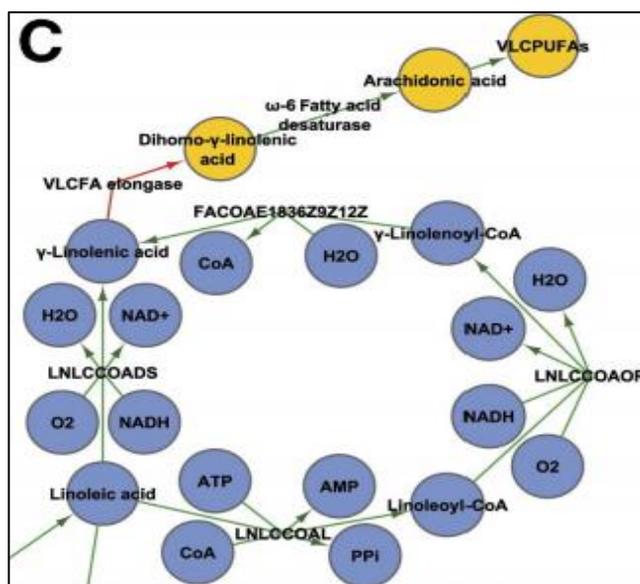
**Fuente:** Chang, R. L. (agosto de 2011). Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Molecular Systems Biology*.

**Figura 12.** Distribución de las transcripciones contabilizadas de la red categorizadas por su estado de verificación. Los códigos de color corresponden al porcentaje notable de transcripción y la secuencia verificada experimentalmente. Por ejemplo, el 42% de las transcripciones de la red se verificó experimentalmente mediante la secuencia de la cobertura del 100%



**Fuente:** Chang, R. L. (agosto de 2011). Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Molecular Systems Biology*.

**Figura 13.** Diagrama vía VLCPUFA. Los nodos azules representan los metabolitos incluidos en iRC1080, y los nodos de color naranja representan metabolitos no incluidos en iRC1080 y por ende que están ausentes en *C. reinhardtii*



**Fuente:** Chang, R. L. (agosto de 2011). Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Molecular Systems Biology*.

**1.8.4 Análisis *in silico* para síntesis de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii* evaluando diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> mediante un modelo FBA.** En 2014 el grupo de investigación de diseño de productos y procesos de la universidad de los Andes, efectuó un análisis del comportamiento de la red de *Chlamydomonas reinhardtii* a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> mediante la implementación del modelo FBA en Xpress, un software utilizado para simulación bioinformática y en el cual la función objetivo, que era la reacción de producción de biomasa fue optimizada. Dicha investigación actualizó la red metabólica de Chang (iRC1080) agregando 87 nuevas reacciones descritas en una matriz estequiométrica que ajustaba el modelo anterior y un nuevo listado de genes sensibles a los cambios de CO<sub>2</sub>, el cual se obtuvo a través una revisión del sistema biológico de *C. reinhardtii* en la base de datos KEGG.(Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Genes sensibles al CO<sub>2</sub> resultantes del análisis FBA para la red complementada

<b>Biological processes</b>	<b>Sensitive genes</b>
Transport, mitochondria	<b>MITC14/MITC18/PTB8/PTB7/PTB1/PTB12/PTB4/PTB2/CRv4_Au5.213.g4507.t1</b>
Phenylalanine tyrosine and tryptophan	<b>AST4/HIS5</b>
TCACycle/CO <sub>2</sub> fixation	<b>ACH1/IDH3/SDH1/SDH2/OGD1</b>
Valine, leucine, and isoleucine degradation	CRv4_Au5.s4.g11844.t1/Crv4_Au5.s12.g3863.t1/CRv4_Au5.s6.g13618.t1/CRv4_Au5.s12.g3863.t1/g1910.t1
Pyruvate metabolism; Glyoxylate metabolism	<b>HYDA1/MFDX/HYDA2/PFL1/ACK2/AACK1/ACK1/PAT1/PAT2/CRv4_Au5.s6.g13230.t1/CRv4_Au5.s2.g9723.t1</b>
Alanine and aspartate metabolism; glycerine, serine, and threonine	<b>AST3/AST1</b>
Carbon fixation	AAT1/ <b>AAT2</b> /MME3/MME6/MDH5/MME2
Glycolysis, Gluconeogenesis, Valine, Leucine, and isoleucine degradation	<b>DLDH1/PDC2/PDH2/ALSS1/ALSL1/PYK1/PYK5/PHG1/GAP3/GAP1/PGM2/PGM5/PGM1B/PGK1/TPIC/FBA1/FBA2/PGI1/GPM2</b>
Transport, extracellular	<b>NAR1.6/NAR1.3/NAR1.4</b>
Pentose phosphate pathway	TAL1/TRK1/RPE1/RPI1
Glycine, serine, and threonine metabolism	Crv4_Au5.s10.g124.t2/THD1/SHMT3
Transport, chloroplast	AOC6/ <b>AOC5/AOT7/DAT1/OMT1/AOT5/FBB13/NAR1.5/NAR1.2/NAR1.1/AAA3/AAA1/CRv4_Au5.s14.g5515.t1/CRv4_Au5.s15.g5921.t1/CRv4_Au5.g14736.t1/MOT20/MIP1/MIP2</b>
Butanoate metabolism	CRv4_Au5.s7.g14479.t1/CRv4_Au5.s16.g6952.t1
Oxidative phosphorylation	<b>NDA3/NUO11/NUO10/NUO13/NUO21/NUO3/NUO5/NUO6/NUO8/NUO9/IPY1/IPY3</b>
Propanoate metabolism	PFL1
Nitrogen metabolism	CGL77/IBA57/GCST

**Fuente:** Páez Melo, D. O. (2014). *In silico* analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 15, (Modificado por el autor).

Para poder identificar los genes que eran sensibles a la modificación de CO<sub>2</sub>, se estableció un coeficiente de sensibilidad descrito en la Ecuación 3.

**Ecuación 3.** Coeficiente de variación de flux sensibles a cambios de CO<sub>2</sub>

$$\rho = \frac{\Delta \gamma_{Reaction i}}{\Delta \gamma_{CO_2 input}}$$

**Fuente:** Páez Melo, D. O. (2014). *In silico* analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 5.

La primera aproximación realizada en esta investigación, fue basada en la red metabólica de Chang *et al.* y en un enfoque en optimización estática (SOA), para luego implementar el enfoque en optimización dinámica (DOA), estableciendo en primera estancia una programación lineal en Xpress debido a las limitaciones no lineales de los flux internos.

La entrada de flux de CO<sub>2</sub> fue variada según la cinética de Monod, ajustado al perfil de crecimiento de biomasa representada en la siguiente ecuación:

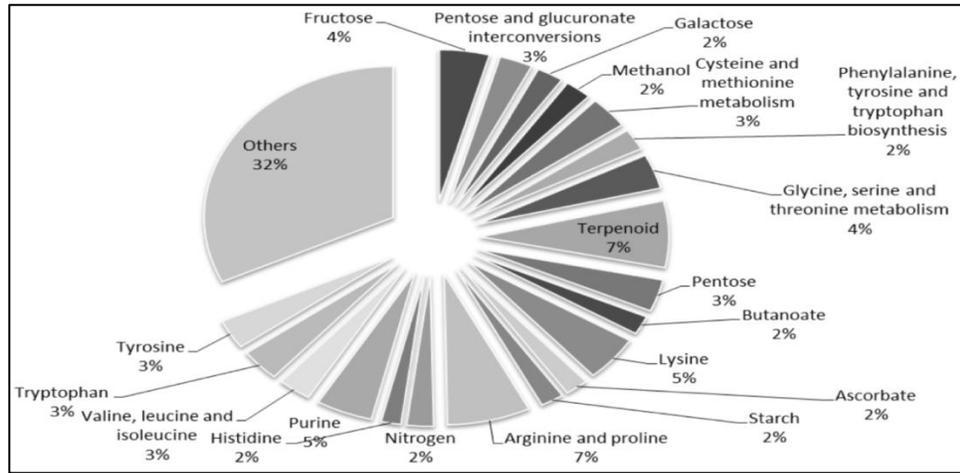
**Ecuación 4.** Cinética de Monod

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_x + S}$$

**Fuente:** Páez Melo, D. O. (2014). *In silico* analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 5.

En la figura 14, se muestra la contribución de esta investigación a la red metabólica, en las proporciones de los nuevos metabolitos agregados a cada una de las reacciones que constituyen el modelo.

**Figura 14.** Porcentajes de nuevos metabolitos aÑadidos a la red metabólica



**Fuente:** Páez Melo, D. O. (2014). In silico analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 1-23.

**1.8.4 Análisis de Balance de Flujo (FBA).** El análisis de balance de flujo (FBA) es una aproximación matemática para analizar los flux de los metabolitos involucrados en una red metabólica, donde permite la predicción del crecimiento celular y las tasas de secreción del producto en estado estacionario. Las ecuaciones lineales que describen el modelo son las siguientes:

$$\begin{aligned}
 & \max_z c^T v \quad (1) \\
 & \text{sujeto a } Sv = 0 \\
 & LB \leq v \leq UB \\
 & c^T \in R^n \mid c^T = [0 \ 0 \ 0 \ \dots \ 1 \ \dots \ 0 \ 0 \ 0] \mid \text{pos}(1) \\
 & \quad = \text{reacción biomasa} \\
 & \quad v \in R^n \\
 & \quad S \in R^{m \times n} \\
 & \quad LB \in R^n \\
 & \quad UB \in R^n
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & n: \text{número de reacciones} \\
 & m: \text{número de metabolitos} \\
 & v = \{v_{R1}, v_{R2}, v_{R3}, \dots, v_{R4273}\} \\
 & R_i = \sum_{j=1}^m a_{ij} * M_j[k] \\
 & M_j[k] = j - \text{Metabolito en } k \\
 & \quad - \text{compartimient}
 \end{aligned}$$

Donde v es el vector de flux, S la matriz estequiométrica, LB y UB, son los límites inferior y superior, C es el vector de ceros que establece la función objetivo, m es el número de metabolitos, n es el número de reacciones, pos(1) es la función objetivo que está relacionada con la biomasa.<sup>37</sup>

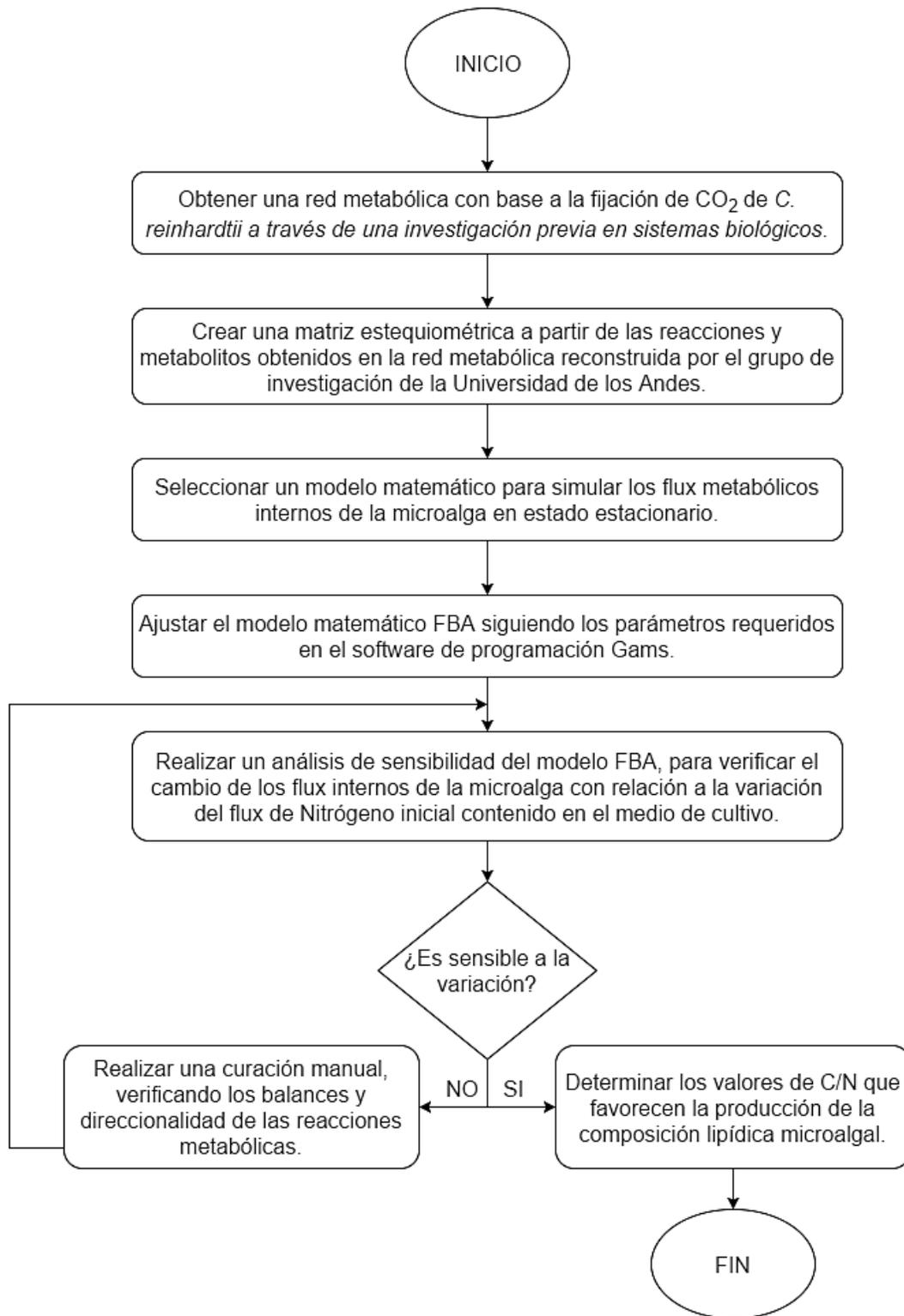
<sup>37</sup> Páez Melo, D. O. (2014). In silico analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 4.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO FBA**

Para realizar el ajuste del modelo FBA basado en la red metabólica reconstruida por el grupo de investigación de Diseño de Productos y Procesos de la Universidad de los Andes, se realizaron las fases descritas en la Figura 15., que conllevan a que el modelo FBA sea sensible al cambio de la relación C/N. Este proceso se realiza con el fin de relacionar la composición lipídica de la biomasa microalgal con las propiedades específicas que describen la calidad del biodiesel.

**Figura 15.** Fases para la implementación del modelo FBA con la red metabólica de *C. reinhardtii* en GAMS®



**2.1.1 Obtención de la red metabólica basada en la fijación de CO<sub>2</sub> de *C. reinhardtii*.** Para ejecutar la simulación del crecimiento de la biomasa microalgal, se inicia con el estudio del sistema biológico correspondiente, el cual involucra las reacciones bioquímicas comprendidas principalmente en la fijación de CO<sub>2</sub> en el metabolismo de *C. reinhardtii*, dicho sistema es proporcionado por el grupo de investigación de Diseño de productos y procesos de la Universidad de los Andes, que por medio de nuevas reacciones metabólicas encontradas en la base de datos KEGG, complementa y actualiza el modelo iRC1080 realizado por Chang *et al.*<sup>38</sup>, proporcionando así los listados finales de las reacciones y los metabolitos restablecidos que se muestran en el ANEXO A. El total de las reacciones y metabolitos involucrados en esta nueva red diseñada se puede observar en la Tabla 4.<sup>39</sup>

**Tabla 4.** Cantidad de reacciones y metabolitos en el modelo iRC1080 y en la nueva red metabólica reconstruida

	iRC1080	Red metabólica reconstruida (*)
<b>N° Metabolitos</b>	1706	2312
<b>N° Reacciones</b>	2191	4273

**Fuente:** Winck, F., Páez Melo, D., Riaño Pachón, D., M. Martins, M., Caldana, C., & González Barrios, A. (2016). Analysis of Sensitive CO<sub>2</sub> Pathways and Genes Related to Carbon Uptake and Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* through Genomic Scale Modeling and Experimental Validation. *Frontiers*, pág. 1-12.

La nueva red metabólica reconstruida distribuye en diferentes proporciones los metabolitos y reacciones que se encuentran organizados en 10 compartimentos celulares (núcleo, citosol, cloroplasto, mitocondria, aparato de Golgi, lumen tilacoidal, glioxisoma, mancha ocular, flagelo y organismo extracelular). A continuación se presenta la proporción de las reacciones (Gráfico 1.) en cada uno de los compartimentos que dividen la célula.

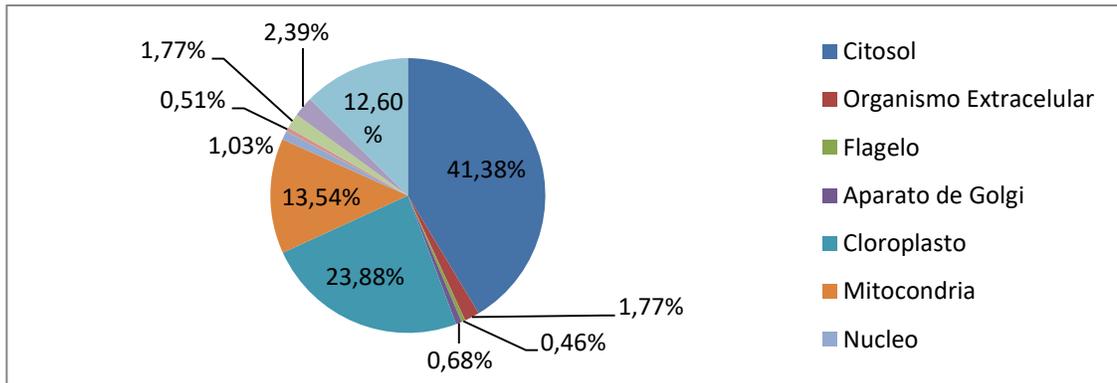
---

\*Red metabólica reconstruida por el grupo de investigación de Diseño de Productos y Procesos de la Universidad de los Andes.

<sup>38</sup> Chang, R. L. (agosto de 2011). Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Molecular Systems Biology*.

<sup>39</sup> Winck, F., Páez Melo, D., Riaño Pachón, D., M. Martins, M., Caldana, C., & González Barrios, A. (2016). Analysis of Sensitive CO<sub>2</sub> Pathways and Genes Related to Carbon Uptake and Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* through Genomic Scale Modeling and Experimental Validation. *Frontiers*, pág. 1-12.

**Gráfico 1.** Proporción de reacciones por compartimento celular

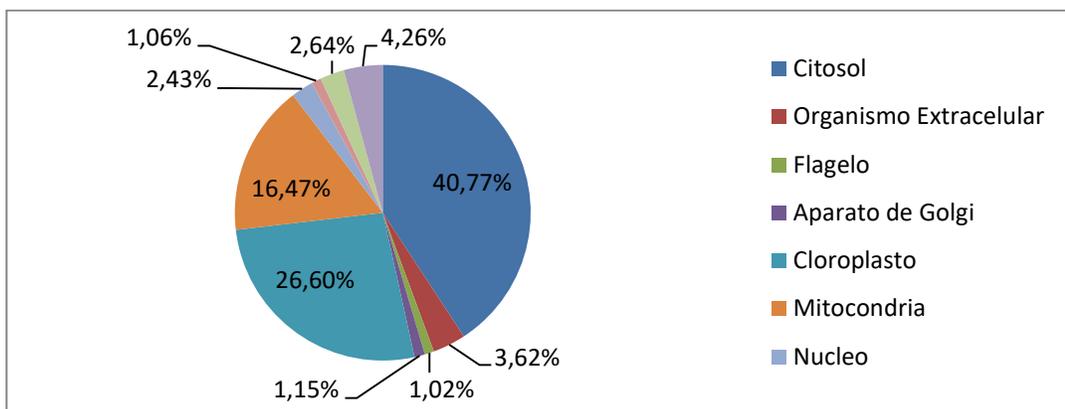


**Fuente:** Páez Melo, D. O. (2014). *In silico* analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 1-23.

La anterior gráfica permite inferir que la mayor parte de la actividad metabólica se realiza en el citosol, la mitocondria y cloroplasto de la microalga. Además aporta un conocimiento previo para desarrollar un estudio del perfil lipídico que presenta la microalga debido a que la principal característica del citosol es el almacenamiento de gran cantidad de gotas de lípidos.

De igual forma el Gráfico 2 evidencia que la mayor parte de los metabolitos de la red metabólica están implicados en los procesos bioquímicos realizados en el citosol, el cual dentro de su constitución contiene triacilgliceridos o ésteres de colesterol en gran proporción.

**Gráfico 2.** Proporción de metabolitos por compartimento celular



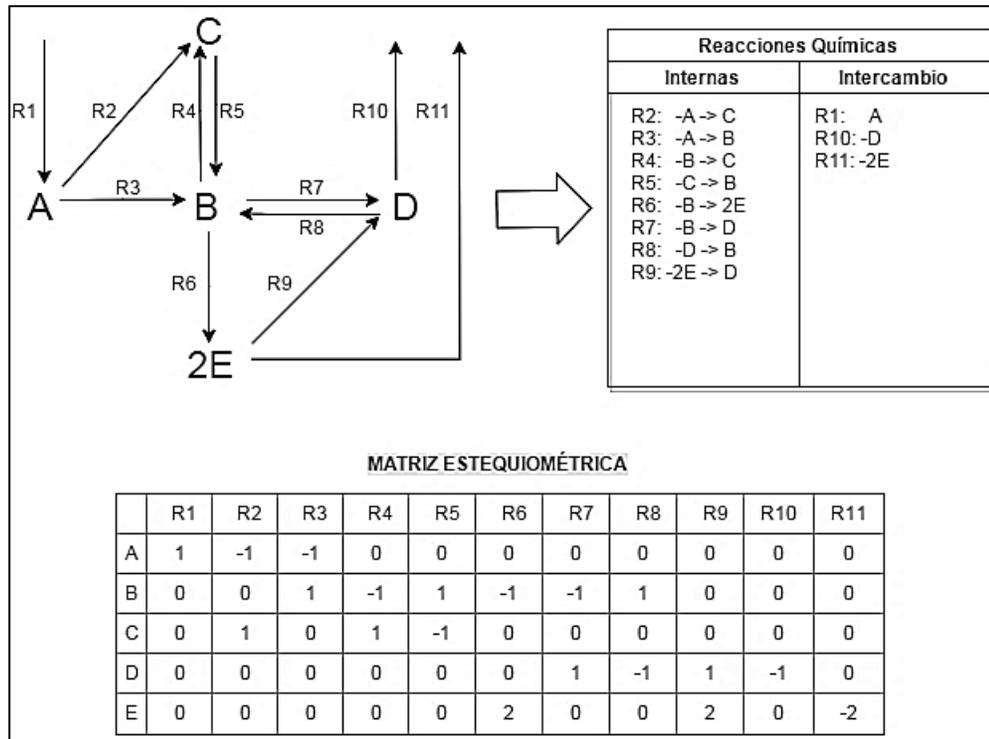
**Fuente:** Páez Melo, D. O. (2014). *In silico* analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 1-23.

**2.1.2 Creación de la matriz estequiométrica basada en la reconstrucción de la red metabólica.** Para la creación de la matriz estequiométrica es necesario conocer las reacciones metabólicas involucradas en la red reconstruida con sus correspondientes coeficientes estequiométricos y direccionalidad.

Con los componentes de la matriz ya identificados, se realiza su construcción en formato TXT colocando el coeficiente estequiométrico del metabolito en la reacción, teniendo en cuenta que si actúa como reactivo se antepone un signo negativo al valor del coeficiente.

En la Figura 16 se muestra un ejemplo gráfico de la transformación de la red metabólica a la matriz estequiométrica en donde las columnas señalan el número que identifica la reacción y las filas los metabolitos involucrados en dichas reacciones:

**Figura 16.** Creación matriz estequiométrica



**Fuente:** A. Jaime-Infante, Z. H.-D. (2014). IHERRAMIENTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS EN UN SISTEMA BIOLÓGICO. *Revista investigacional operaciona*, pág. 96-103, (Modificado por los autores).

La matriz queda expresada en términos de metabolito en su debido compartimento por la reacción que lo contiene.

La matriz con las reacciones actualizadas por el grupo de investigación de Diseño de productos y procesos de la Universidad de los Andes en el lenguaje de programación de GAMS<sup>®</sup> se muestra en el **ANEXO B**.

### 2.1.3 Desarrollo del problema de programación lineal del modelo FBA en el software GAMS<sup>®</sup>

**2.1.3.1 Análisis de balance de flujo (FBA).** Con el fin de analizar el comportamiento del sistema biológico de *Chlamydomonas reinhardtii*, y teniendo en cuenta que no se conocen las concentraciones iniciales de los metabolitos ni los detalles de la cinética enzimática del sistema, es conveniente asumir que la red metabólica trabaja bajo las condiciones de un sistema estacionario. Esta técnica es implementada para conocer el valor de los flux de triglicéridos y la influencia de la relación carbono-nitrógeno en la síntesis de lípidos de la microalga, maximizando la tasa de crecimiento y preservando la concentración interna de los metabolitos involucrados.

Teniendo en cuenta la matriz estequiométrica elaborada en formato TXT, se procede a plantear la función objetivo y sus restricciones correspondientes, basadas en las siguientes ecuaciones lineales que describen el modelo FBA:<sup>40</sup>

$$\begin{array}{ll}
 \max_z c^T v & (1) \\
 \text{sujeto a } Sv = 0 & \\
 LB \leq v \leq UB & \\
 c^T \in R^n \mid c^T = [0 \ 0 \ 0 \ \dots \ 1 \ \dots \ 0 \ 0 \ 0] \mid \text{pos}(1) & \\
 = \text{reacción biomasa} & \\
 v \in R^n & \\
 S \in R^{m \times n} & \\
 LB \in R^n & \\
 UB \in R^n &
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 n: \text{número de reacciones} = 4273 \\
 m: \text{número de metabolitos} = 2312 \\
 v = \{v_{R1}, v_{R2}, v_{R3}, \dots, v_{R4273}\} \\
 R_i = \sum_{j=1}^m a_{ij} * M_j[k] \\
 M_j[k] = j - \text{Metabolito en } k \\
 \qquad \qquad \qquad - \text{compartimento}
 \end{array}$$

Donde:

- $v$  : vector de flux
- $S$  : matriz estequiométrica
- $LB$ : límite inferior para cada reacción metabólica
- $UB$ : límite superior para cada reacción metabólica
- $c$ : vector de ceros que establece la función objetivo
- $m$ : número de metabolitos
- $n$ : número de reacciones

<sup>40</sup> Páez Melo, D. O. (2014). *In silico* analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 4.

- $pos(1)$  : es la función objetivo que está relacionada con la biomasa.

**2.1.3.2 Implementación del modelo FBA al lenguaje de programación lineal en GAMS®.** El listado de los datos de ingreso al programa (GAMS®) se presentan definido a continuación para la red metabólica de *C. reinhardtii*.

- Set de variables: Variables del problema. Ver **ANEXO C** (listados de metabolitos, reacciones, límites inferior y superior para cada reacción).
- Ecuaciones: función objetivo de biomasa, funciones de límites superior (UB) y límite inferior (LB).
- Título del modelo: FBA *C. reinhardtii*
- Solución: “maximizar función objetivo de biomasa Z”

En las ecuaciones presentadas a continuación, se encuentran establecidos los parámetros anteriormente mencionados que definen el problema de programación lineal para maximizar el flux de biomasa.

**Ecuación 5.** Función objetivo FBA

$$\begin{aligned} \max_z c^T v &= z \\ \text{sujeto a } Sv &= 0 \end{aligned}$$

Donde z es la función objetivo, c es el vector de ceros con valor de 1 en la reacción que representa la biomasa microalgal, v es el vector de flux para cada reacción y S es la matriz estequiométrica.

**Ecuación 6.** Ecuación de restricción de función objetivo

$$LB \leq v \leq UB$$

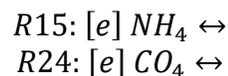
Donde LB representa el límite inferior y UB el límite superior para cada reacción de la red metabólica, que se establecieron entre un rango de -1000 a 1000  $\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{pesoseco}}^{-1}$ , basado en el modelo iRC1080 de Chang *et al.*

Para maximizar la función objetivo del problema matemático planteado anteriormente, se establece un solver de programación lineal usando el modelo FBA.

Los parámetros anteriormente presentados del modelamiento de la red metabólica de *C. reinhardtii* se encuentran definidos en función de la variación de la concentración de Nitrógeno contenido en el cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) disuelto en el medio de cultivo y en un valor fijo de Carbono tomado del  $\text{CO}_2$  suministrado al bioreactor.

**2.1.3.3 Evaluación del efecto de la relación C/N sobre la biomasa.** Para realizar la evaluación del efecto de la relación C/N sobre la biomasa microalgal obtenida por medio del modelo FBA, se deben establecer las dos reacciones más relevantes de la simulación de la red metabólica que representan el Nitrógeno presente en el medio de cultivo y el flux de Carbono alimentado al bioreactor (Ecuación 7).

**Ecuación 7.** Reacciones que involucran el Nitrógeno y Carbono alimentado al cultivo de *C. reinhardtii*



A continuación se establecen unos coeficientes de flux para las dos reacciones que están dentro del rango de -1000 a 1000 ( $\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{pesoseco}}^{-1}$ ) y se verifica que el resultado del flux de biomasa cambie cada vez que se le ingresa un valor diferente de carbono y nitrógeno, para con esto verificar que reacciones de la relación C/N están siendo afectadas bajo esas condiciones; sin embargo, en este punto de la programación, no se evidencia un cambio en el flux de la biomasa en el modelo a la variación en la concentración de nitrógeno y carbono, por ende la relación C/N no presenta efecto alguno sobre el valor del resultado de flux de biomasa que arroja la programación, por tal razón se decide realizar una curación manual de la red metabólica revisando diferentes bases de datos asociadas a la red genómica de *C. reinhardtii*.

**2.1.4 Curación de la red metabólica de *C. reinhardtii*.** Una reconstrucción metabólica a escala genómica inicial no representa a la perfección las diferentes rutas metabólicas que ocurren a nivel celular debido a la alta variabilidad de lenguajes de programación bioinformática que describen el flux de metabolitos, por esta causa se hace necesaria una verificación sistemática con el fin de asegurarse que no existan inconsistencias y que todas las indicaciones que figuran son correctas y además correspondan a las interacciones entre los metabolitos y las reacciones que se describen teóricamente en los ciclos metabólicos de la microalga.

La curación a la reconstrucción metabólica es realizada mediante una revisión exhaustiva de los pathways existentes para *C. reinhardtii* en las bases de datos de KEGG, BioCyc y BiGG Models, donde se eligieron los tres compartimentos (citosol, cloroplasto y mitocondria) que presentan mayor actividad intracelular en la microalga y a su vez las principales rutas que se involucran en la biosíntesis de lípidos. Por medio de ésta revisión fue posible la identificación de:

- Ciclos termodinámicos (ecuaciones repetidas que se bloqueaban a sí mismas).
- Irreversibilidad termodinámica en las reacciones metabólicas.
- Ecuaciones no balanceadas estequiométricamente.
- Falta de balanceo de protones de Hidrógeno.

Por consiguiente, se procedieron a hacer las correcciones pertinentes para solucionar cada uno de los errores y faltantes previamente mencionados; de allí se obtuvo un nuevo listado de reacciones reduciendo el número inicial de reacciones de 4273 a 3590 y por el contrario aumentando el número de metabolitos de 2312 a 2350, dichos listados se pueden ver en el **ANEXO D**.

**2.1.5 Evaluación del efecto del nitrógeno en el modelo de red metabólica de *C. reinhardtii*.** Luego de realizar la curación manual, se vuelve a verificar la evaluación del efecto de la relación C/N sobre la biomasa microalgal en el modelo FBA de la red metabólica, dicho análisis parte de las reacciones directamente ligadas a los compuestos de interés, en este caso la reacción número 15 que contiene el nitrógeno de intercambio y la reacción número 24 que contiene el CO<sub>2</sub> de intercambio.

Al determinar que el modelo FBA es sensible a los cambios realizados en la reacción número 15 establecida en la Ecuación 7., se buscan los valores de flux de nitrógeno de entrada al programa, para lo cual es necesario realizar una consulta bibliográfica que proporcione datos experimentales obtenidos de diferentes cultivos de microalga, de los cuales se eligen los flux de nitrógeno y carbono que favorecen la síntesis de lípidos para calcular las diferentes relaciones C/N que incrementan el valor porcentual de lípidos en biomasa.

**2.1.6 Determinación de los valores de C/N que favorecen la producción de lípidos en *C. reinhardtii*.** Se sabe que si el mayor interés de un cultivo de *C. reinhardtii*, es la recuperación de lípidos para la producción de biocombustibles, el mejor porcentaje de CO<sub>2</sub> corresponde al del 5% CO<sub>2</sub> contenido en el aire suministrado al bioreactor, debido que a esta condición se produce tanto una mayor cantidad de lípidos como una composición de FAME similar a la reportada para biocombustibles<sup>41</sup>, por tal razón para calcular el valor fijo de carbono se tuvo en cuenta el límite máximo (1000 mmol \* h<sup>-1</sup> \* g<sub>pesoseco</sub><sup>-1</sup>) establecido en la ecuación de restricción para el vector de flux del modelo y se trabaja con el 5% de este valor, es decir  $50 \frac{\text{mmol CO}_2}{\text{h} * \text{g}_{\text{pesoseco}}}$

---

<sup>41</sup> ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

### Ecuación 8. Determinación del flux inicial de CO<sub>2</sub>

$$\text{flux de CO}_2 = \frac{\text{porcentaje teórico de CO}_2 * \text{valor de flux máximo de CO}_2}{100\%}$$

$$\text{flux de CO}_2 = \frac{5 * 1000 \frac{\text{mmol CO}_2}{\text{h} * \text{g}_{\text{peseseco}}}}{100}$$

$$\text{flux de e CO}_2 = 50 \frac{\text{mmol de CO}_2}{\text{h} * \text{g}_{\text{peseseco}}}$$

Lo siguiente es calcular los diferentes flux de nitrógeno de intercambio, para lo cual se tuvo en cuenta que la relación C/N en microalgas oscila entre un rango de 6 a 9<sup>42</sup>. Pero además es necesario considerar que reportes experimentales arrojan que las relaciones carbono-nitrógeno evaluadas específicamente para aumentar la síntesis de lípidos son 4, 7 y 9.<sup>43</sup> Por esta razón se decide evaluar las siguientes relaciones C/N: 4, 6, 7 y 9, y con base a estos valores calcular los flux de nitrógeno que con el carbono fijo puedan mantener las relaciones elegidas.

### Ecuación 9. Determinación del flux inicial de Nitrógeno

$$\text{flux inicial de N}_2 = \frac{\text{flux inicial de CO}_2}{\text{relación C/N}}$$

Teniendo los valores de variación de flux de nitrógeno (Tabla 5.) se ingresan como restricción de igualdad al modelo de red de *C. reinhardtii* establecido en GAMS<sup>®</sup>, no sin antes dejar como valor fijo el flux inicial de CO<sub>2</sub> previamente calculado. Los resultados que arroja el modelo son; el flux de biomasa que en este caso es diferente con cada concentración de nitrógeno y los flux de los diferentes ácidos grasos y triglicéridos.

<sup>42</sup> Martínez, A. R. (abril de 2011). Puesta en marcha de un cultivo de cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. *Riunet*, pág. 1-102.

<sup>43</sup> Rodríguez González, A., & Serrano Luna, F. (2012). Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio.

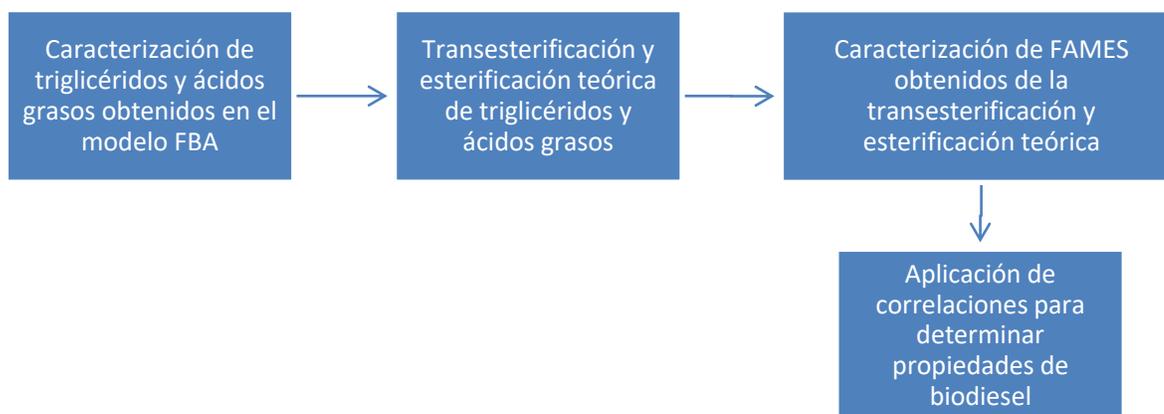
**Tabla 5.** Flux de carbono y nitrógeno ingresados a GAMS® para la simulación de la producción lipídica en *C. reinhardtii*

$\text{CO}_2 \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g}_{\text{pesoseco}} \cdot \text{h}} \right)$	$\text{NH}_4 \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g}_{\text{pesoseco}} \cdot \text{h}} \right)$	C/N
50	12.5	4
50	8.3	6
50	7	7
50	5.5	9

## 2.2 ASOCIACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO OBTENIDO DEL MODELO FBA DE *C. reinhardtii* CON LAS PROPIEDADES DEL BIODIESEL

Con el fin de trazar una ruta estratégica que asocie el perfil lipídico obtenido mediante el modelado de la red metabólica, con las principales propiedades que describen la calidad del biodiesel, se plantean 4 etapas establecidas en el siguiente diagrama:

**Figura 17.** Diagrama general de ruta estratégica de asociación del perfil lipídico de *C. reinhardtii* con las propiedades del biodiesel

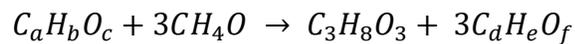


**2.2.2 Caracterización de triglicéridos y ácidos grasos obtenidos mediante el modelo de programación FBA de *C. reinhardtii*.** Después de obtener los flux de los triglicéridos y ácidos grasos resultantes, es necesario realizar una caracterización teórica para identificar las formulas moleculares y estructurales correspondientes a cada uno ellos mediante consulta bibliográfica. Esto con el fin de tener claro la forma de llevar a cabo la transesterificación y esterificación de cada uno de los TAG y ácidos grasos para obtención de esteres de metilo.

**2.2.3 Transesterificación y esterificación teórica de los triglicéridos y ácidos grasos caracterizados.** Teniendo las formulas moleculares de los triglicéridos y ácidos grasos obtenidos, se procede a realizar una transesterificación y esterificación de forma teórica para conseguir los esteres de metilo que se obtendrían con una conversión correspondiente al del 100%.

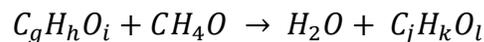
Este proceso se realiza con base a las reacciones generales de transesterificación y esterificación, teniendo en cuenta que si lo obtenido es un triglicérido, primero se debe someter a un proceso de transesterificación y luego a una esterificación; si por el contrario el flux obtenido del modelo de reconstrucción de la red metabólica corresponde a un ácido graso, se debe realizar directamente una esterificación.

**Ecuación 10.** Reacción general de transesterificación de triglicérido



La Ecuación 10, describe de manera general la forma teórica en la que se realiza la transesterificación; donde a, b y c corresponden a los subíndices conocidos de carbono, hidrogeno y oxigeno del triglicérido a transesterificar, y d, e, y f, son los subíndices a determinar de carbono, hidrogeno y oxigeno correspondientes al ácido graso resultante de la transesterificación.

**Ecuación 11.** Reacción general de esterificación ácido graso



La Ecuación 11, es una representación general de la esterificación, donde g, h, e i, corresponden a los subíndices conocidos de carbono, hidrogeno y oxigeno del ácido graso obtenido de la transesterificación del paso anterior; y j, k y l son los subíndices a determinar de carbono, nitrógeno y oxigeno del éster de metilo (FAME).

Con base a la estequiometria de las reacciones definidas previamente se establecen las siguientes ecuaciones matemáticas con el fin de obtener el valor numérico de los subíndices desconocidos de los productos (d, e, f, j, k, y l).

**Ecuación 12.** Determinación del número de carbono del ácido graso obtenido de la transesterificación

$$d = \frac{a}{3}$$

Donde:

d= número de carbono del ácido graso resultante.

a= número de carbono del triglicérido conocido.

**Ecuación 13.** Determinación del número de hidrógeno del ácido graso obtenido de la transesterificación

$$e = \frac{b + 4}{3}$$

Donde:

e= número de hidrógeno del ácido graso resultante.

b= número de hidrógeno del triglicérido conocido.

**Ecuación 14.** Determinación del número de oxígeno del ácido graso obtenido de la transesterificación

$$f = \frac{c}{3}$$

Donde:

f= número de hidrógeno del ácido graso resultante.

c= número de hidrógeno del triglicérido conocido.

**Ecuación 15.** Determinación del número de carbono del éster de metilo obtenido de la esterificación

$$j = g + 1$$

Donde:

j= número de carbono del éster de metilo resultante.

g= número de hidrógeno del ácido graso conocido.

**Ecuación 16.** Determinación del número de hidrógeno del éster de metilo obtenido de la esterificación

$$k = h + 2$$

Donde:

k= número de hidrógeno del éster de metilo resultante.

h= número de hidrógeno del ácido graso conocido.

El subíndice de oxígeno correspondiente al éster de metilo obtenido tras la esterificación, es estequiométricamente igual al número de oxígeno en el ácido graso que reacciona con el metanol, es decir que  $l$  es igual a  $i$ .

**2.2.4 Caracterización de ésteres de metilo (FAME).** Teniendo ya la fórmula molecular de los ésteres de metilo obtenidos de la transesterificación y la esterificación, es necesario conocer la fórmula estructural de cada uno de ellos mediante una revisión bibliográfica, esto con el objetivo de identificar la cantidad de dobles enlaces entre los átomos de carbono existentes y por ende determinar la cantidad de ésteres de metilo saturados e insaturados que componen al biodiesel. Cabe aclarar que estos datos son parámetros absolutamente necesarios para aplicar las correlaciones utilizadas para calcular las propiedades del biodiesel que se obtendría bajo las diferentes relaciones C/N trabajadas en el modelo de red planteado.

**2.2.5 Aplicación de correlaciones para determinar propiedades de biodiesel.** Con base a una revisión bibliográfica de métodos de predicción de propiedades físicas para la producción de biodiesel, se eligieron las 6 propiedades más relevantes para determinar su calidad, de las cuales 3 son propiedades a bajas temperaturas (punto nube, punto de filtro frío y punto de fluidez) y las 3 restantes, corresponden a las principales establecidas para cualquier tipo de biocombustible (viscosidad cinemática, número de cetano y punto de inflamación).

Estas correlaciones se pueden aplicar con sólo dos variables; el número promedio de átomos de carbono totales en la composición final del biodiesel y el valor promedio de la cantidad de dobles enlaces de los FAME obtenidos. Además se cuentan con parámetros fijos que han sido establecidos por el método de predicción para cada ecuación dependiendo de la propiedad a calcular.

**Ecuación 17.** Determinación de viscosidad cinemática, número de cetano o punto de inflamación

$$y = AN_C + BN_{DB}$$

Donde:

$y$  = propiedad del biodiesel (viscosidad cinemática, número de cetano o punto de inflamación)

$A, B$  = coeficientes establecidos para cada propiedad.

$N_C$  = número promedio ponderado de átomos de carbono

$N_{DB}$  = número promedio ponderado de dobles enlaces

La viscosidad cinemática es dada en unidades de  $\text{mm}^2/\text{s}$  y el punto de inflamación en grados Celsius.

**Ecuación 18.** Determinación de propiedades a bajas temperaturas

$$y = AN_C + BU_{FAME}$$

Donde:

y= propiedad del biodiesel a bajas temperaturas (punto nube, punto de filtro o punto de fluidez) en grados Celsius.

A, B= coeficientes establecidos para cada propiedad

$N_C$  = número promedio ponderado de átomos de carbono

$U_{FAME}$  = composición de FAME insaturados en el biodiesel

En la siguiente figura se evidencian los coeficientes A y B establecidos para cada propiedad:

**Tabla 6.** Parámetros establecidos para el cálculo de propiedades del biodiesel

<b>Propiedad Biodiesel</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Viscosidad Cinemática	0.235	-0.468
Número de cetano	3.930	-15.936
Punto de inflamación	23.362	4.854
Punto nube	18.134	-0.790
Punto de fluidez	18.880	-1.000
Punto de filtro	18.019	-0.804

**Fuente:** Yung-Chieh Su, Y. L. (2011). Selection of Prediction Methods for Thermophysical Properties for Thermophysical Properties for Process Modeling and Product Design of Biodiesel Manufacturing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, pág. 6827.

### 3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

#### 3.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO FBA EN GAMS®

**3.1.1 Curación de la red metabólica reconstruida de *C. reinhardtii*.** Luego de haber establecido la metodología en el capítulo anterior, se procede a realizar el análisis de los resultados obtenidos.

Inicialmente se muestra la Tabla 7, donde se evidencian el total de las reacciones y metabolitos obtenidos después de la curación de la red metabólica.

**Tabla 7.** Resultado de metabolitos y reacciones después de realizar la curación de la red metabólica reconstruida

	Red metabólica reconstruida (grupo de investigación)	Red metabólica actualizada
<b>N° Metabolitos</b>	2312	2350
<b>N° Reacciones</b>	4273	3509

Aunque usualmente la curación de una red metabólica es una actividad que ocupa un largo tiempo de trabajo, se decidió detener la curación y la programación en este punto debido a que se observa una alta sensibilidad del modelo a la variación de flux de Nitrógeno en la reacción que proviene del medio extracelular.

**3.1.2 Evaluación del efecto de la relación C/N en el modelo FBA.** Uno de los principales resultados de esta investigación, es la evaluación del modelo FBA de la red metabólica que se evidencia en el aumento del valor de la función objetivo de biomasa a medida que se aumenta la relación C/N, y se disminuyen los flux de nitrógeno alimentado en la reacción 15 del modelo, manteniendo un valor del flux de carbono constante.

**Tabla 8.** Resultados del valor de flux de la reacción biomasa en cada punto de C/N

C/N	Flux metabólico de la biomasa de <i>C. reinhardtii</i> (h <sup>-1</sup> )
4	0.664278
6	1.780264
7	2.125689
9	5.524255

Con el aumento de flux que presenta la biomasa de la microalga, se continua con el estudio de los componentes del perfil lipídico de *C. reinhardtii*.

**3.1.3 Composición lipídica obtenida por medio de la simulación del crecimiento de la biomasa de *C. reinhardtii*.** Tomando el flux experimental de CO<sub>2</sub> en 5% como valor constante, y variando el flux de la reacción que introduce amonio al medio como fuente de Nitrógeno, se establecen 4 puntos de relación C/N para a determinar los lípidos obtenidos en la microalga.

El primer paso al ajustar el modelo FBA en GAMS®, es identificar los ácidos grasos y triglicéridos que resultan tras la simulación y verificar el comportamiento de sus flux correspondientes con respecto a la variación en los valores de la relación C/N (Anexo E).

Los principales lípidos que se obtienen por el modelo se muestran en la Tabla 9, los cuales se llevan a un estudio posterior para calcular las propiedades que definen la calidad del biodiesel.

**Tabla 9.** Lípidos resultantes en la simulación realizada en GAMS®

Nombre en base de datos BiGG	Formula Molecular
Hexadecanoate (n-C16:0)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/18:0)	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/18:1(11Z))	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(9Z)/16:0)	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(9Z)/18:0)	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(9Z)/18:1(11Z))	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(9Z)/18:1(9Z))	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(9Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(9Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:0/18:1(9Z)/18:0)	C <sub>57</sub> H <sub>108</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:0/18:1(9Z)/18:1(11Z))	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:0/18:1(9Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:0/18:1(9Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(11Z)/16:0)	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(11Z)/18:0)	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(11Z)/18:1(11Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(11Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(11Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>

**Tabla 9.** (Continuación)

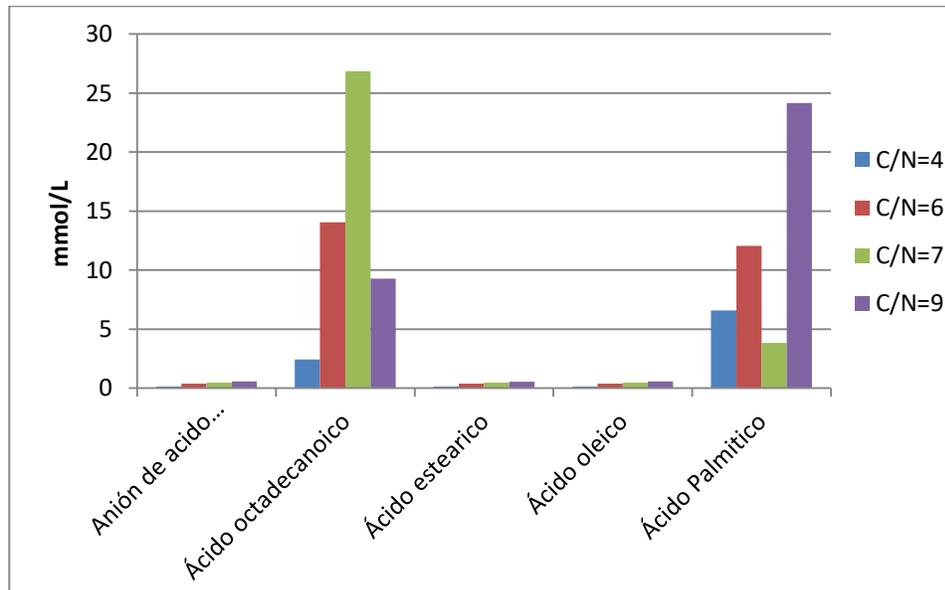
<b>Nombre en base de datos BiGG</b>	<b>Formula Molecular</b>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(9Z)/16:0)	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(9Z)/18:0)	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(9Z)/18:1(11Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(9Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(9Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(11Z)/16:0)	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(11Z)/18:0)	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(11Z)/18:1(11Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(11Z)/18:1(9Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(11Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(11Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(9Z)/16:0)	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(9Z)/18:0)	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(9Z)/18:1(11Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(9Z)/18:3(5Z,9Z,12Z))	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(9Z)/18:4(5Z,9Z,12Z,15Z))	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/16:0)	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/18:1(9Z))	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:0/18:1(9Z)/18:1(9Z))	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(11Z)/18:1(9Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(11Z)/18:1(9Z)/18:1(9Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>
Triacylglycerol (18:1(9Z)/18:1(9Z)/18:1(9Z))	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>

### 3.2 RUTA ESTRATÉGICA QUE ASOCIA LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA CON LA CALIDAD DEL BIODIESEL

Los resultados del análisis y la asociación del perfil lipídico con la calidad de biodiesel, se discuten en el siguiente capítulo, haciendo énfasis en la cantidad de esteres de metilo obtenidos tras las reacciones de transesterificación y esterificación, y su relación con la propiedades de biodiesel calculadas mediante ecuaciones de predicción matemática.

**3.2.1 Transesterificación de los lípidos obtenidos en la simulación en GAMS®.** A partir del perfil lipídico resultante de la simulación del crecimiento microalgal en GAMS®, se hace una transesterificación de cada uno de los triglicéridos para obtener una composición de ácidos grasos. Luego, al establecer los valores de la relación C/N se logran identificar los ácidos grasos que se obtienen en la red metabólica programada en estado estacionario.

**Gráfico 3.** Ácidos grasos obtenidos de la transesterificación a diferentes valores de la relación C/N



El modelo FBA arroja una composición lipídica basada en triglicéridos, que por medio de un proceso de transesterificación teórica se transforman en ácidos grasos; de los cuales los ácidos octadecanoico y palmítico se obtienen en mayor proporción a diferencia del anión de ácido oleico, ácido esteárico y ácido oleico, cuyos valores de flux son menores.

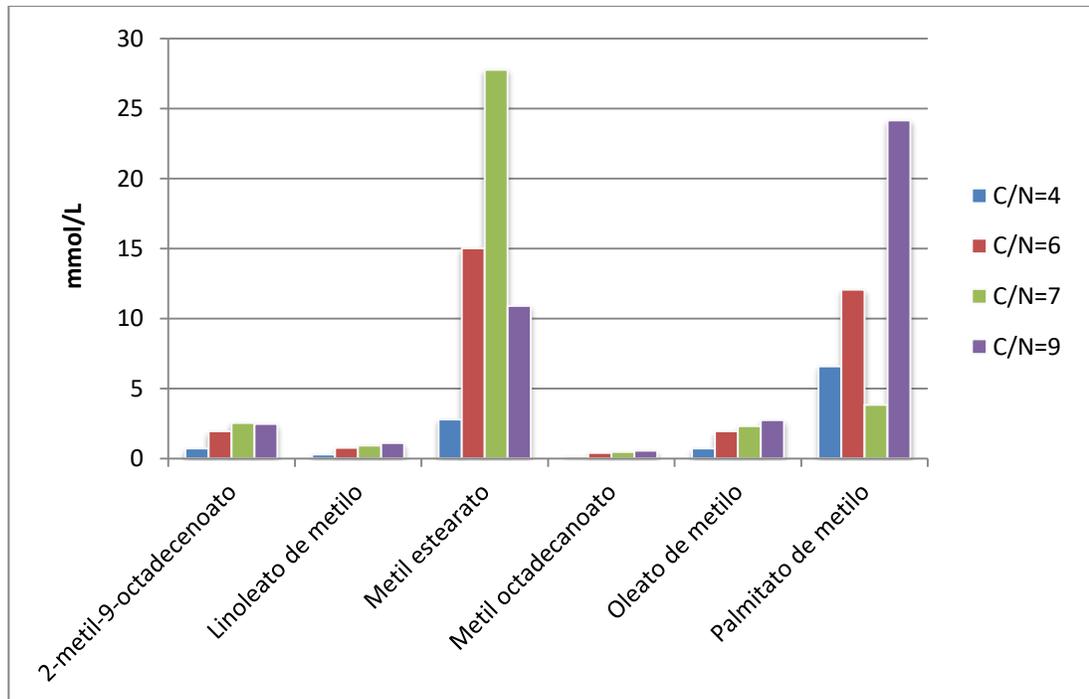
**3.2.2 Esterificación de los ácidos grasos pertenecientes a la biomasa de *C. reinhardtii*.** Luego de identificar los ácidos grasos obtenidos, se someten a una esterificación teórica planteada con una conversión del 100% y que proporciona como resultado 5 tipos de ésteres de metilo que sumados al resultante directamente del modelo FBA en GAMS®, componen el cuadro que se muestra a continuación .

**Cuadro 7.** Ésteres de metilo obtenidos después de la esterificación del ácido graso

Ácido graso	Éster de metil
Anión de ácido oleico	2-metil-9-octadecenoato
Linoleato de metilo	Linoleato de metilo
Ácido octadecanoico	Metil estearato
Ácido esteárico	Metil octadecanoato
Ácido oleico	Oleato de metilo
Ácido Palmítico	Palmitato de metilo

**3.2.3 Caracterización de ésteres de metilo (FAME).** Al conocer los ésteres de metilo resultantes de la esterificación teórica de los ácidos grasos establecida con un porcentaje de conversión igual a 100, se comparan los flux de los FAMES obtenidos al variar los valores de la relación C/N en: 4, 6, 7 y 9.

**Gráfico 4.** Ésteres de metilo obtenidos por el modelo FBA a diferentes valores de la relación C/N

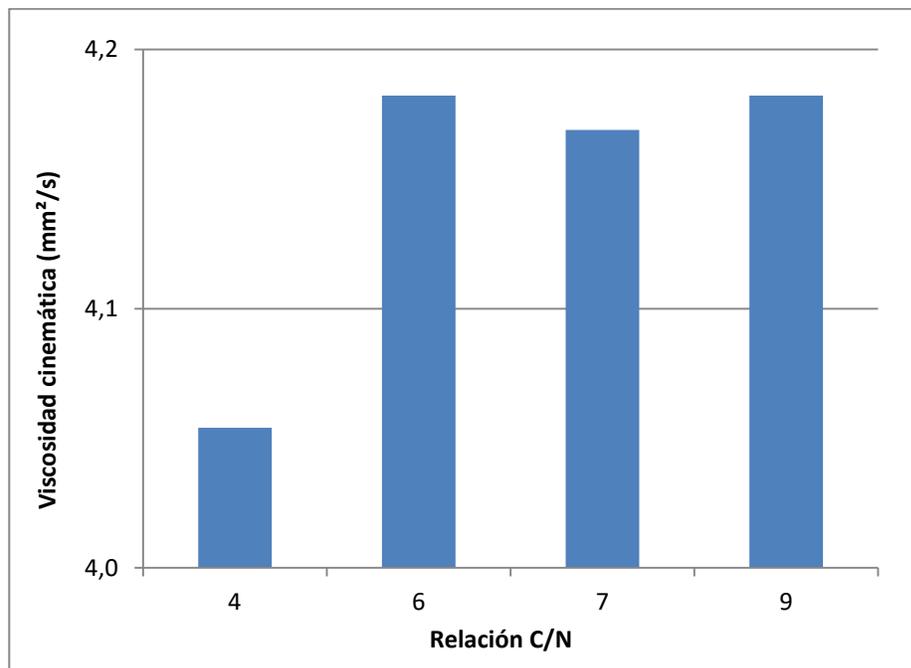


Al observar el gráfico 4, se concluye que el modelo da como resultado 6 tipos de ésteres de alquilo, donde se obtienen en mayor proporción el metil estearato y palmitato de metilo y en menor proporción los 4 restantes (2-metil-9-octadecenoato, linoleato de metilo, metil octadecanoato y oleato de metilo).

Adicional a lo anterior, se evidencia mayor cambio de los flux en la relación C/N=7, generando el flux más alto en el metil estearato.

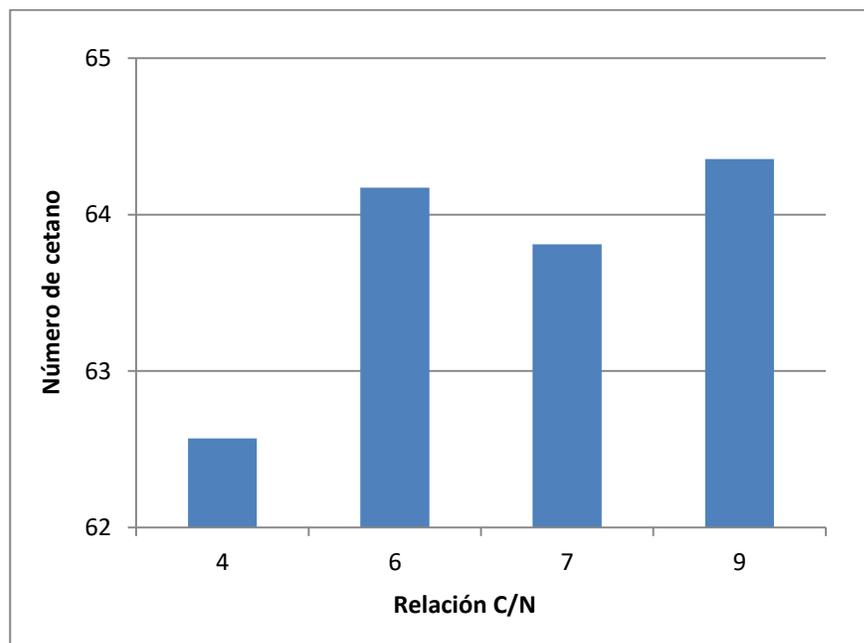
**3.2.4 Predicción de las propiedades del Biodiesel.** Para la predicción de los parámetros de calidad del biodiesel se calculan 6 tipos de propiedades termofísicas, tres que se relacionan directamente con la eficacia del biocombustible a partir de microalgas, (viscosidad cinemática, numero de cetano y punto de inflamación) y tres que evalúan la operatividad del biodiesel a bajas temperaturas (punto nube, punto de filtro frio y punto de fluidez).

**Gráfico 5.** Viscosidad cinemática evaluada a diferentes valores de la relación C/N



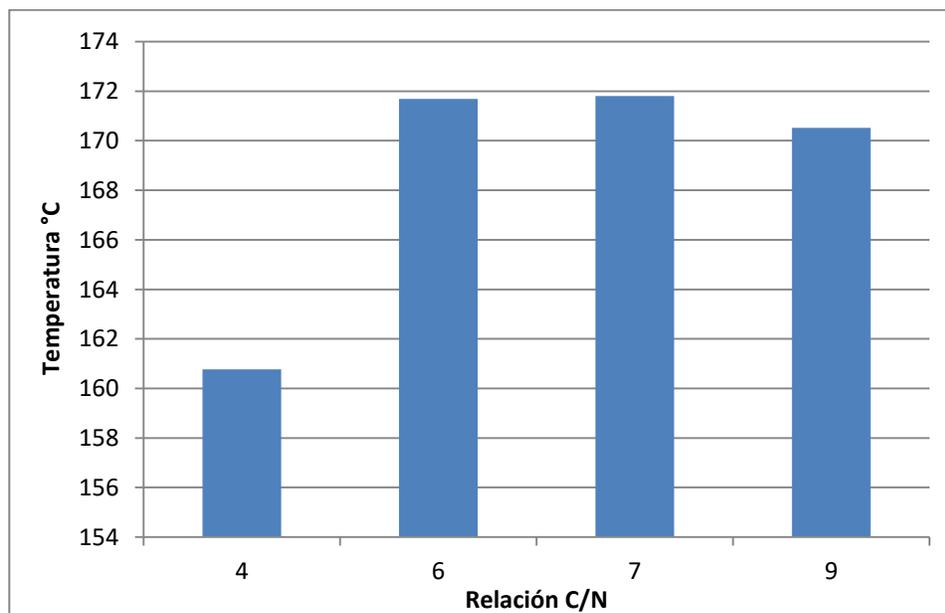
Al calcular la viscosidad cinemática a una temperatura de referencia igual a 40°C establecida por el modelo de predicción de propiedades, se logra observar que sus valores se encuentran dentro de un rango entre 4 y 4.2 mm<sup>2</sup>/s, lo cual según lo instituido por normas internacionales, están dentro de los valores normales de trabajo que conllevan a una combustión adecuada del biocombustible en el motor. Por otra parte se evidencia una mayor viscosidad cinemática en las relaciones C/N iguales a 6 y 9, a diferencia de la relación C/N igual a 4, en donde se puede notar que el biodiesel obtenido a esta condición tiene una menor resistencia a la fluidez.

**Gráfico 6.** Número de cetano evaluado a diferentes valores de la relación C/N



Respecto al número de cetano estimado, se infiere que su valor se encuentra dentro de un rango entre 63 y 65, lo cual refiere que el tipo de biodiesel obtenido a partir de cultivos de *C. reinhardtii*, con diferentes relaciones de flux de carbono y nitrógeno, es un biodiesel de calidad que tendrá un menor tiempo de retardo de ignición que cumple con el valor mínimo estándar ( $nc=47$ ) establecido por la norma internacional. Así mismo se evidencia que el biodiesel obtenido a relaciones de C/N iguales a 6 y 9, tienen el mayor número de cetano, lo cual asegura una mayor eficiencia.

**Gráfico 7.** Punto de inflamación evaluado a diferentes valores de la relación C/N

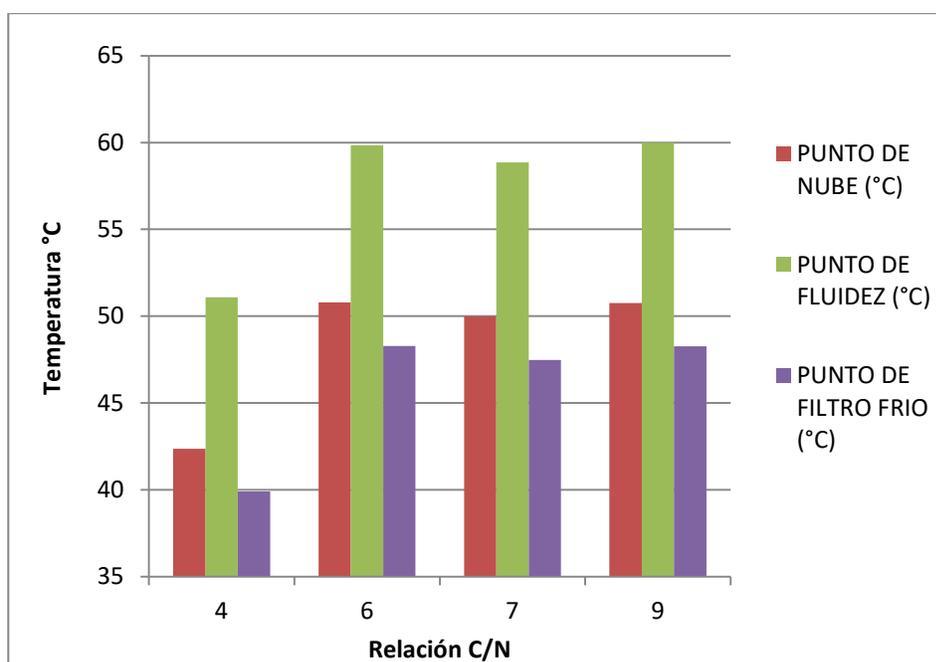


Según la gráfica expuesta anteriormente, el valor del punto de inflamación estimado para cada tipo de biodiesel obtenido a diferente relación C/N, supera por mucho el valor mínimo de 130°C establecido por la norma ASTM 6751 (S500). Esto indica, que el biodiesel que se obtiene a estas condiciones tiene un menor riesgo de inflamación debido a que el rango de temperaturas se encuentra entre 160 y 172 °C, valores que determinan calidad y seguridad del biocombustible a usar, siendo el biodiesel obtenido con una relación C/N igual a 4 el que menor temperatura de inflamación tiene y el que representa un mayor riesgo si se compara con los obtenidos a la relaciones de C/N restantes.

Comparando con las especificaciones establecidas por la norma ASTM (American Society for Testing and Materials) D6751-09 y por la norma Europea para Biodiesel, los valores de viscosidad cinemática, número de cetano y punto de inflamación calculados por las correlaciones matemáticas expuestas en este estudio, se encuentra dentro del rango de operatividad del biodiesel de la norma. Ver ANEXO F y G.

El siguiente gráfico, es una comparación de las propiedades a bajas temperaturas (punto nube, punto de fluidez y punto de filtro frío) calculadas para los diferentes tipos de biodiesel obtenidos, donde se observa que estas propiedades disminuyen cuando se establecen flux de carbono y nitrógeno cuya relación entre si sea igual 4, y por el contrario aumentan trabajando con una relación C/N igual a 6.

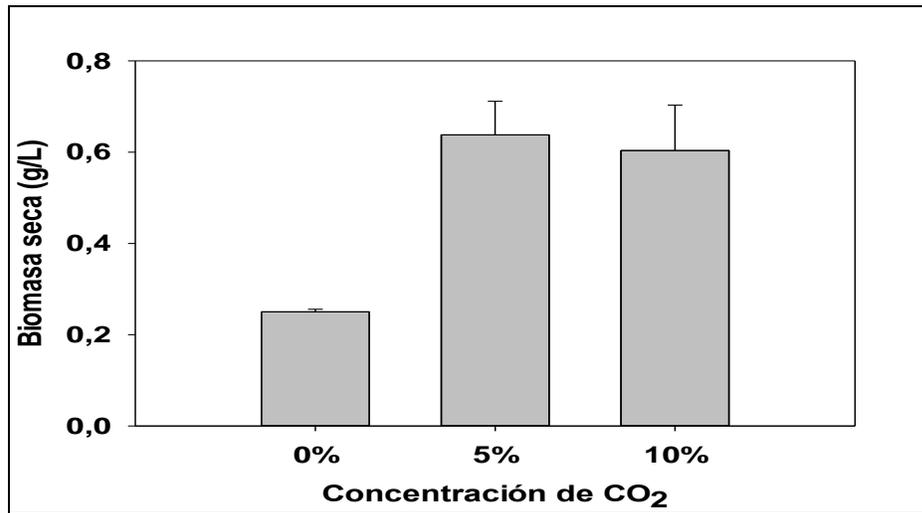
**Gráfico 8.** Propiedades a baja temperatura, evaluadas a diferentes valores de la relación C/N



### 3.3 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MODELO FBA CON DATOS EXPERIMENTALES PROPORCIONADOS POR GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE DISEÑO DE PRODUCTOS Y PROCESOS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

En esta sección se presentan las gráficas que resumen los resultados de la experimentación llevada a cabo por el grupo de investigación de diseño de productos y procesos de la universidad de los Andes, en la cual se evalúa el efecto de CO<sub>2</sub> sobre la producción de biomasa y lípidos de *C. reinhardtii*. Dicha investigación se toma como fuente preliminar del flux de carbono a ingresar a la simulación desarrollada en este proyecto, debido a que una de las conclusiones obtenidas de aquella investigación es que la máxima producción de lípidos y biomasa se presenta cuando se trabaja con un flux de 5% de CO<sub>2</sub> suministrado al bioreactor como se muestra en la Figura 18. Por consiguiente el valor fijo de carbono corresponde al 5% del flux determinado en el límite superior para la ecuación de restricción para el vector de flux.

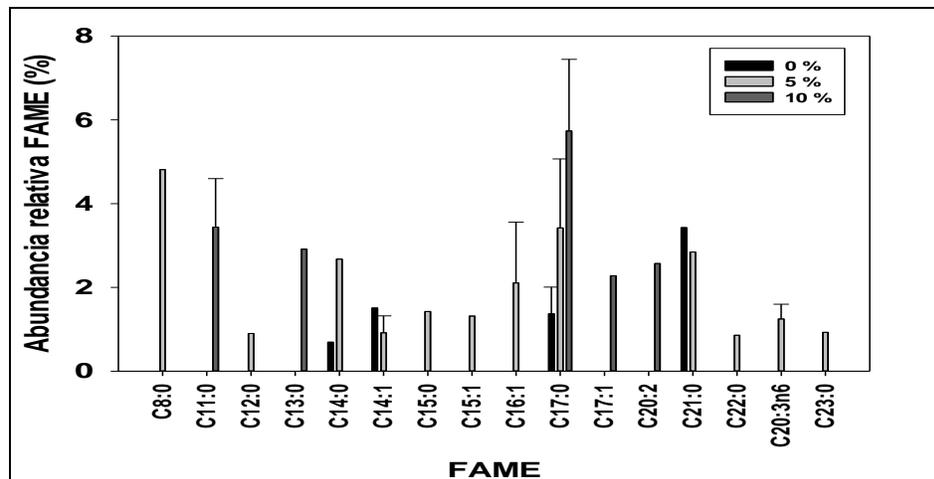
**Figura 18.** Influencia de la concentración de CO<sub>2</sub> en la producción de biomasa en el cultivo total (peso seco (g/L))



**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

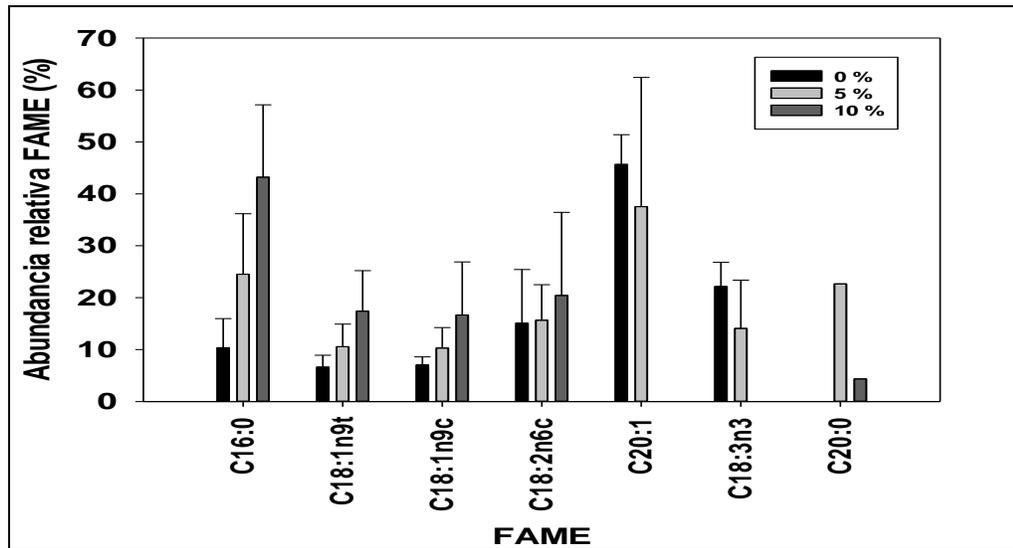
Lo siguiente es un balance realizado entre las proporciones de FAMES obtenidos de la cromatografía gases realizada por el grupo de investigación de la universidad de los andes (Figuras 19 y 20) y los porcentajes de los flux determinados en la programación (Gráfico 9)

**Figura 19.** Influencia de la concentración de CO<sub>2</sub> en la Composición del extracto lipídico de *C. reinhardtii*



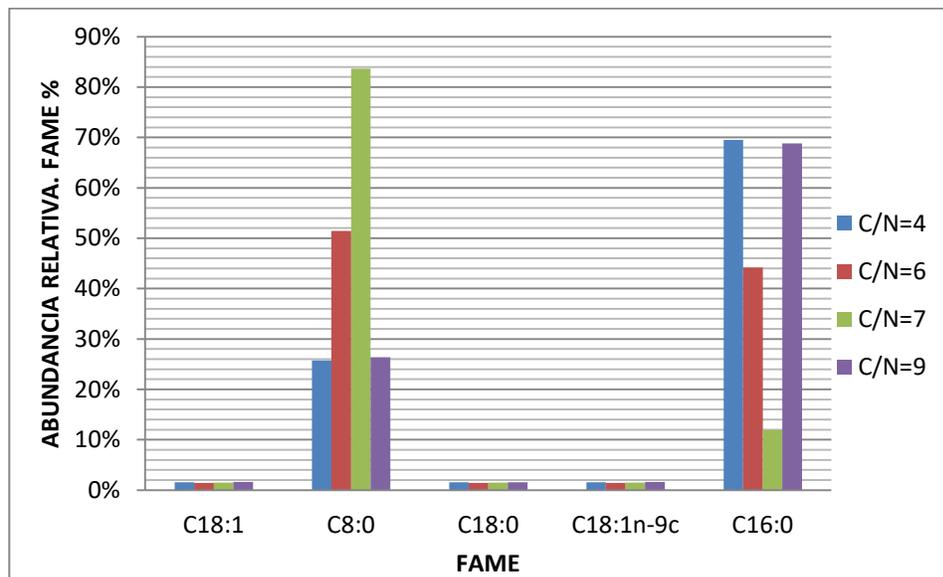
**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Figura 20.** Influencia de la concentración de CO<sub>2</sub> en la Composición del extracto lipídico de *C. reinhardtii*



**Fuente:** ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Gráfico 9.** Proporción de FAMEs obtenidos de la programación del modelo FBA a 5% de CO<sub>2</sub>



Realizando una comparación entre el gráfico 9 con las figuras 19 y 20 se logra establecer una relación entre el modelo ejecutado en Gams y la extracción en cuanto al tipo de FAMEs, más específicamente considerando los casos del C8:0 (Ácido caprílico) y C16:0 (Ácido palmítico) presentes en las figuras 19 y 20

respectivamente. Cabe aclarar que los porcentajes de FAMEs resultantes presentan algunas diferencias entre sí y que además no se obtuvo un amplio perfil del extracto lipídico de la microalga a partir de la programación desarrollada en este proyecto, sin embargo, es válido atribuir este suceso a la conversión ideal del 100% que se considera para cada una de las reacciones involucradas en la síntesis lipídica, cuya consecuencia es la ausencia de trazas de los ácidos grasos que no reaccionan tras la esterificación y que por el contrario se encuentran como subproductos que se logran identificar en el perfil obtenido de la cromatografía realizada en la experimentación.

#### 4. CONCLUSIONES

- El modelo FBA utilizado para ajustar la red metabólica, resultó ser una herramienta robusta que permitió considerar todas las reacciones involucradas en el sistema biológico de *C. reinhardtii*, de allí se lograron estudiar diferentes ciclos involucrados en la síntesis de lípidos y así identificar los 42 tipos de lípidos resultantes y sus respectivos valores de flux.
- Debido al efecto del nitrógeno presentado sobre el modelo reconstruido de *C. reinhardtii*, fue factible el análisis de 4 diferentes valores de C/N, estableciendo que la relación que favorece la producción de lípidos en microalga tiene un valor igual a 9, con 50 mmol/L de carbono y 5,5 mmol/L de nitrógeno, dando en consecuencia un valor de flux total de lípidos igual a 41,95 mmol/L, es decir que la cantidad de lípidos obtenidos resulta ser inversamente proporcional al flux de nitrógeno, y que por ende si se quiere aumentar la cantidad de lípidos se debe disminuir la concentración de Nitrógeno en el medio.
- La ruta estratégica desarrollada en esta investigación se fundamentó en las reacciones de transesterificación y esterificación teóricas que dieron como resultado los diferentes FAMES contenidos en el biodiesel producido a partir de biomasa de la microalga *C. reinhardtii* en función del flux inicial de nitrógeno de intercambio contenido en el amonio suministrado al medio de cultivo. Dicha composición de esteres de alquilo, fue necesaria para realizar la predicción de diferentes propiedades termofísicas, lo que permitió concluir que la propiedad más sensible a la variación de la relación C/N es el número de cetano, el cual aumenta en relaciones iguales a 6, 7 y 9, debido a la presencia en mayor proporción del estearato de metilo, teniendo un valor aproximado de  $nc$  igual a 65, lo que según normas internacionales garantiza un menor tiempo entre la inyección del combustible y el inicio de la combustión.
- En la viscosidad cinemática se obtuvo un valor aproximado de 4,2 mm<sup>2</sup>/s en C/N=6, 7 y 9, si se requiere la disminución en el valor de ésta propiedad se debe trabajar en condiciones de C/N=9 o superior donde se genera en mayor proporción el linoleato de metilo debido a que según estudios este componente presenta en el biodiesel valores aproximados de viscosidad cinemática de 3,14 mm<sup>2</sup>/s, lo que según normas internacionales entre más bajo sea el valor garantiza una combustión completa y menor formación de depósitos carbonosos en los inyectores.
- Según la evaluación del punto de inflamación, cabe establecer, que las relaciones C/N que más favorecen el aumento de la temperatura de esta

propiedad son iguales a 6 y 7, con valores de punto de inflamación iguales a 171 °C.

- Con respecto a las propiedades del biodiesel a baja temperatura, el biocombustible producido bajo las condiciones establecidas en la simulación, no es adecuado para su uso en ambientes de bajas temperaturas. Por ende si en los requerimientos del cliente, es obligatorio obtener menores temperaturas de estas propiedades se recomienda disminuir el valor de flux del nitrógeno disuelto en el medio de cultivo por debajo de 5,5 mmol/L, debido a que a este flux, cuya relación C/N corresponde a 9, se presenta una mayor proporción de esteres de alquilo insaturados; más específicamente del oleato de metilo, cuyo punto de fusión corresponde a -20°C, lo cual favorece la disminución del valor de las temperaturas de punto nube, fluidez y filtro frio.
- Al realizar la comparación con los datos experimentales proporcionados por el grupo de investigación de Diseño de Productos y Procesos de la Universidad de los Andes, fué posible determinar que el perfil lipídico de la microalga *C. reinhardtii*, contiene en su composición tanto en una prueba real, como en una simulación de la red metabólica que toma condiciones ideales, los esteres de alquilo correspondientes a ácido caprílico y ácido palmítico.

## 5. RECOMENDACIONES

- Utilizar un modelo que trabaje en estado no estacionario, para así poder calcular las concentraciones internas que varían con el tiempo en el sistema biológico de la microalga.
- Evaluar el modelo FBA a diferentes valores iniciales de concentración de carbono, con el fin de poder observar si cambia el comportamiento de la composición lipídica microalgal
- Considerar en la simulación otra fuente de nitrógeno que sea alimento en el medio de cultivo de la microalga que permita mayor producción de lípidos en la simulación del microorganismo.
- Utilizar otros métodos de predicción matemática más rígidos para predecir las propiedades del biodiesel, donde se considere el % de masa, peso molecular y fracción molar de los lípidos obtenidos en la simulación.
- Realizar una experimentación donde los resultados además de evaluar la fuente de carbono como alimento, se considere el nitrógeno del medio, para así poder realizar la relación (C/N) y poder hacer una comparación más completa con los resultados del modelo FBA.

## BIBLIOGRAFÍA

- A. Jaime-Infante, Z. H.-D. (2014). IHERRAMIENTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS EN UN SISTEMA BIOLÓGICO. *Revista investigacional operaciona*, pág. 96-103.
- Adriana Garibay Hernandez, R. V.-D. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *Bio Tecnología*, pág. 39- 40.
- Albarracín, I. (2007). *MICROALGAS: POTENCIALES PRODUCTORAS DE BIODIESEL*. Buenos Aires: Centro de Estudios Internacionales para el Desarrollo.
- Ani Manichaikul, L. G. (Agosto de 2009). Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *ResearchGate*, pág.1-9.
- Biology Boom*. (Mayo de 2016). Obtenido de <http://biologyboom.com/type-chlamydomonas-only-for-b-s/>
- C., F., RJ, S., & B., T. (2005). Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. *Trens in Microbiology*, 13, pág. 550-558.
- Campbell, M. K. (2009). *BIOQUÍMICA 6th ed*. CENGAGE Learning.
- Chang, R. L. (agosto de 2011). Metabolic network reconstruction of Chlamydomonas offers insight into light-driven algal metabolism. *Molecular Systems Biology*.
- Cubero, R. G. (2012). PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA ELIMINACIÓN FOTOSÍNTÉTICA DE CO<sub>2</sub>. 197.
- Derner, R. (2006). Microalgas, productos y aplicaciones. *Ciencia Rural*, pág. 1959-1967.
- ESPINOSA, C. H. (2016). Evaluación del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento y la producción de biomasa de Chlamydomonas reinhardtii.
- García, Y. (Diciembre de 2014). *conceptodefinicion.de*. Obtenido de <http://conceptodefinicion.de/viscosidad/>
- González Céspedes, A. M. (Junio de 2016). CULTIVOS DE MICROALGAS A GRAN ESCALA: SISTEMAS DE PRODUCCIÓN. *ADNagro(18)*, pág. 1-14.
- Gualtieri, L. B. (2006). *Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis Group.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El Instituto, 1998.

\_\_\_\_\_. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El Instituto, 2008.

\_\_\_\_\_. Referencias documentales para fuentes de información electrónica. NTC 4490. Bogotá: El Instituto, 1998.

Karlsson, Nookaew, Petranovic. (2011). Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome.

Leislly Dariana Galindo Vega, S. S. (2010). *Adaptación del método de extracción Bligh y Dyer a la extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de biodiesel.*

Martinez, A. R. (abril de 2011). Puesta en marcha de un cultivo de cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. *Riunet*, pág. 1-102.

Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *ELSEVIER*, 217-232.

MOTORGIGA. (s.f.). (Cetano) Numero de. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <https://diccionario.motorgiga.com/diccionario/cetano-numero-de-definicion-significado/gmx-niv15-con193496.htm>

Nemose. (2008). *Chlamydomonas reinhardtii*. MetaMicrobe. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://www.metamicrobe.com/chlamy/#tax>

Páez Melo, D. O. (2014). In silico analysis for determining sensitive routes and genes related to carbon uptake through Flux balance analysis in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* when different CO<sub>2</sub> concentrations are evaluated. *Uniandes*, pág. 1-23.

Ramirez Navas, J. S. (2006). INTRODUCCIÓN A LA REOLOGÍA DE ALIMENTOS. *ReCiTeIA*, pág. 45.

Rivera Solis, R. A. (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Revista Ciencia*, pág. 2-9.

Rodriguez González, A., & Serrano Luna, F. (2012). *Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de chlorella vulgaris UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio.*

*Salud y Riesgos.* (s.f.). Punto de inflamación. [Consultado en Julio 2016]. Disponible en <http://www.saludyriesgos.com/-/punto+de+inflamacion>

Singh Nigam, P., & Singh, A. (ENERO de 2010). Production of liquid biofuels from renewable resources. *ELSEVIER*, pág. 1-17.

Winck, F., Páez Melo, D., Riaño Pachón, D., M. Martins, M., Caldana, C., & González Barrios, A. (2016). Analysis of Sensitive CO<sub>2</sub> Pathways and Genes Related to Carbon Uptake and Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* through Genomic Scale Modeling and Experimental Validation. *Frontiers*, pág. 1-12.

Yaguchi. (2012). *Metabolic Network Reconstruction Process.*

Yung-Chieh Su, Y. L. (2011). Selection of Prediction Methods for Thermophysical Properties for Thermophysical Properties for Process Modeling and Product Design of Biodiesel Manufacturing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, pág. 6809-6836.

## **ANEXOS**

**ANEXO F**  
**NORMA ASTM PARA BIODIESEL D6751-09**

<b>Tabla 1. Norma astm para biodiésel D6751-09</b>				
Propiedad	Limite		Unidad	Método de prueba
	Min	Max		
Punto de inflamación	93		°C	D 93
Control de alcohol Debe cumplir con una de las siguientes: 1. Contenido de metanol 2. Punto de inflamación	130	0,2	masa % °C	EN 14110 D93
Agua y sedimento		0,050	% volumen	D2709
Número ácido		0,50	mg KOH / g	D664
Ceniza sulfatada		0,020	% masa	D874
Corrosión lámina de cobre		No. 3		D130
Residuo de carbono		0,050	% masa	D4530
Viscosidad cinemática	1,9	6,0	mm <sup>2</sup> /s	D445
Número de cetano	47			D613
Punto de turbidez		Reporte	°C	D2500
Filtrabilidad de impregnado en frío		360	Segundos	Anexo A1
Estabilidad de oxidación	3		horas	EN 14112
Glicerina libre		0,020	% masa	D6584
Glicerina total		0,240	% masa	D6584
Sodio y potasio, combinados		5	ppm (µg/g)	EN 14538
Calcio y magnesio, combinados		5	ppm (µg/g)	EN 14538
Azufre*		0,0015 0,05	% masa (ppm)	D5453
Contenido de fósforo		0,001	% masa	D4951
Temperatura destilación, Temperatura atmosférica equivalente, 90% recuperado		360	°C	D1160

**Fuente:** Fuente: Knothe, G. (2010). Calidad del combustible biodiésel y la norma astm. PALMAS, Vol 31(Especial, Tomo II), pág. 164.

## ANEXO G

### NORMA EUROPEA PARA BIODIESEL EN 14214-2008

Tabla 2. Norma Europea para Biodiésel en 14214 – 2008				
Propiedad	Límite		Unidad	Método de prueba
	Min	Max		
Contenido de éster	99.5			en 14103
Punto de inflamación	101		°C	en iso 2719 en iso 3679
Contenido de metanol		0.20	% (m/m)	en 14110
Contenido de agua		500	mg/kg	en iso 12937
Valor ácido		0.50	mg KOH / g	en 14104
Ceniza sulfatada		0.02	% (m/m)	iso 3987
Corrosión lámina de cobre	No. 1			en iso 2160
Residuo de carbono (10% residuo dist.)		0.30	% (m/m)	en iso 10370
Contaminación total		24	mg/kg	en 12662
Densidad a 15°C	860	900	kg/m <sup>3</sup>	en iso 3675 en iso 12185
Viscosidad cinemática	3.5	5.0	mm <sup>2</sup> /s	en iso 3104
Número de cetano	51			en iso 5165
Estabilidad de oxidación, 110°C	6		horas	en 14112
Glicerina libre		0.020	% (m/m)	en 14105 en 14106
Glicerina total		0.240	% (m/m)	en 14105
Contenido de monoglicéridos		0.80	% (m/m)	en 14105
Contenido de diglicéridos		0.20	% (m/m)	en 14105
Contenido de triglicéridos		0.20	% (m/m)	en 14105
Índice de yodo		120	g yodo / 100 g	en 14111
Contenido de ácido linolénico		12	% (m/m)	en 14103
Contenido de fame con $\geq 4$ enlaces dobles		1	% (m/m)	
Metales Grupo I (Na + K)		5	mg/g	en 14108 en 14109 en 14538
Metales Grupo II (Ca + Mg)		5	mg/g	en 14538
Azufre		10	mg/kg	en iso 20846 en iso 20884
Contenido de fósforo		4	mg/kg	en 14107

**Fuente:** Fuente: Knothe, G. (2010). Calidad del combustible biodiésel y la norma astm. PALMAS, Vol 31(Especial, Tomo II), pág. 165.

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Agosto - 2016

## AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Nosotros **Laura Lorena Cardoso Chicué** y **Yuri Tatiana Prieto Cristancho** en calidad de titulares de la obra **Desarrollo de una ruta estratégica que relaciona la proporción Carbono Nitrógeno (C/N) alimentado al cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* con la calidad del Biodiesel**, elaborada en el año **2015**, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad de América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

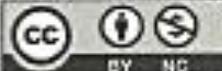
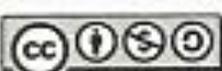
Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad de América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.

	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Agosto - 2016

- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **Licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

- 
 Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.
- 
 Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.
- 
 Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.

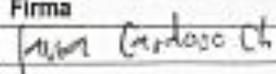
Licencias completas: [http://co.creativacommons.org/?page\\_id=11](http://co.creativacommons.org/?page_id=11)

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

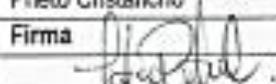
Para constancia se firma el presente documento en Bogotá, a los 27 días del mes de Octubre del año 2016.

#### LOS AUTORES:

##### Autor 1

Nombres	Apellidos
Laura Lorena	Cardoso Chicué
Documento de Identificación No.	Firma
1010202946	

##### Autor 2

Nombres	Apellidos
Yuri Tatiana	Prieto Crisnacho
Documento de Identificación No.	Firma
1015433940	

Nota: Incluya un apartado (copie y pegue el cuadro anterior), para los datos y la firma de cada uno de los autores de la obra.