



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**Influencia de la concentración de melaza
pretratada y fósforo para la producción de
lípidos en *Coelastrella***

TESIS QUE PRESENTA
RIGOBERTO DÍAZ CRUZ

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. Diciembre 2020

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada número 909558.

Al Fondo Sectorial SENER-CONACYT: Fortalecimiento Institucional para la Sustentabilidad Energética, por el apoyo otorgado a través del Proyecto: “Consolidación del Laboratorio de Energía Renovable del Sureste.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por permitirme realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.

A la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda por su asesoramiento, dirección y observaciones a lo largo de la realización de toda la fase experimental y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Hugo Virgilio Perales Vela por brindar su tiempo para la evaluación del proyecto.

A mis revisores, M. en C. Gloria Garduño Solórzano y Dr. Jesús Alvarado Flores por tomarse el tiempo para revisar la tesis y aportar comentarios para su mejoramiento.

A la Q.A. Tanit Toledano Thompson por brindarme su ayuda, tiempo y consejos en la fase experimental.

A mis amigas, Maricarmen, Emmanuelle, Fanny, Ileana, Katia y especialmente Rosario, por hacer esta etapa de mi vida más enriquecedora y brindarme su amistad sincera y genuina.

A mi familia, por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones.

“He actuado como un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndome al encontrar rocas más pulidas y conchas más bonitas de lo usual, pero tenía al inmenso océano frente a mí y todo por descubrir”.

-Isaac Newton

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1.....	3
1.1 Microalgas.....	3
1.1.1 Clasificación.....	3
1.1.2 Composición bioquímica.....	4
1.1.3 Condiciones operacionales de cultivo	4
1.1.4 Agitación y densidad celular	5
1.1.5 Nutrientes	6
1.2 Melaza.....	12
1.3 Coelastrella.....	14
1.3.1 Biosíntesis de lípidos por <i>Coelastrella</i>	14
1.3.2 Producción de lípidos por <i>Coelastrella</i>	17
1.4 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).....	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 2.....	24
1.5 Material biológico	24
1.6 Melaza.....	24
1.6.1 Pretratamiento ácido de la melaza.....	24

1.6.2	Cromatografía líquida de alta resolución	25
1.7	Medios de cultivo	25
1.8	Purificación de las cepas	26
1.8.1	Choque ácido.....	26
1.8.2	Cultivo en medio de cultivo sólido.....	27
1.8.3	Resuspensión en medio de cultivo líquido.....	27
1.9	Cultivo microalgal.....	27
1.9.1	Conteo celular	27
1.10	Recuperación de la biomasa	28
1.11	Extracción de lípidos.....	28
1.12	Cromatografía de capa delgada	29
1.13	Análisis estadístico.....	30
CAPITULO 3	31
1.14	Purificación de los cultivos	31
1.15	Pretratamiento de la melaza	34
1.16	Crecimiento de <i>Coelastrella</i> sp. cepa CORE-1	36
1.17	Crecimiento de <i>Coelastrella</i> sp. CORE-2 y CORE-3 en medio de cultivo TAP.....	37
1.18	Crecimiento de <i>Coelastrella</i> sp. cepas CORE-2 y CORE-3 en presencia de melaza pretratada.....	37
1.19	Producción de biomasa.....	41
1.20	Producción de lípidos.....	45
1.21	Cromatografía de capa delgada del extracto final	49
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA.....		53
ANEXOS.....		63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición bioquímica de microalgas en porcentaje de peso seco [39].	4
Tabla 1.2 Macro y micronutrientes esenciales para el cultivo de microalgas [2, 44].....	7
Tabla 1.3 Principales características de la melaza de caña de azúcar [34].....	13
Tabla 2.1 Medios de cultivos usados.....	26
Tabla 3.1 Identificación y cuantificación de los azúcares contenidos en las muestras de melaza, antes y después del pretratamiento.	34
Tabla 3.2 Contenido de la melaza antes y después del pretratamiento	36
Tabla 3.3 Crecimiento de CORE-2 cultivadas en los diferentes medios de cultivos.	38
Tabla 3.4 Crecimiento de CORE-3 cultivadas en los diferentes medios de cultivos.	40
Tabla 3.5 Concentraciones y productividades de biomasa por CORE-2 y CORE-3 después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de glucosa de melaza pretratada y fosfatos en volumen de 250 mL. Media de los datos \pm D.E. (n =3). N/A sin datos experimentales.	41
Tabla 3.6 Variables de proceso con sus unidades y niveles utilizados en el Diseño Experimental. 43	
Tabla 3.7 Matriz de diseño experimental del diseño Box-Behnken que muestra los efectos de las variables del proceso en la respuesta de salida (g L ⁻¹ de producción de biomasa). N/A sin datos experimentales.....	44
Tabla 3.9 Concentración, contenido y productividad de lípidos obtenidos por CORE-2 y CORE-3 en los diferentes medios suplementados con melaza. N/A: sin datos experimentales.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Géneros de algas. Macroalgas a) <i>Macrocystis</i> , b) <i>Sargassum</i> , c) <i>Ulva</i> y d) <i>Codium</i> ; microalgas e) <i>Chlorella</i> , f) <i>Scenedesmus</i> , g) <i>Coelastrum</i> y h) <i>Spirulina</i>	3
Figura 1.2 Esquema de la fotosíntesis por microalgas [54].	15
Figura 1.3 Esquemmatización de la biosíntesis de ácidos grasos en microalgas realizada en los cloroplastos [38].....	16
Figura 1.4 Esquemmatización simplificada de la biosíntesis de TAGs en microalgas [38].	17
Figura 2.1 Microalgas usadas. A) CORE-1, B) CORE-2 y C) CORE-3.....	24
Figura 2.2 Hematocitómetro Neubauer.....	28
Figura 3.1 Cultivos madre. De derecha a izquierda: CORE-1, CORE-2 y CORE-3.	31
Figura 3.2 Cultivos en medio de cultivo sólido (TAP-Agar) posterior al tratamiento con HCl. A) CORE-1, B) CORE-2 y C) CORE-3.....	32
Figura 3.3 Obtención de colonias unialgales de CORE-3 posterior al segundo proceso de purificación.	32
Figura 3.4 Cultivos microalgales tratados con HCl y estriado en medio sólido. CORE-1 antes (A) y después (B); CORE-2 antes (C) y después (D); CORE-3 antes (E) y después (F).	33
Figura 3.5 Cultivo celular de CORE-1, donde se aprecia la eliminación completa de los aglomerados celulares presentados anteriormente.....	34
Figura 3.6 Cromatograma de HPLC de la melaza antes (A) y después (B) del pretratamiento. Las identidades de los picos del 1 al 3 fueron: fructosa, glucosa y sacarosa. Se analizaron 20 μ L de cada muestra por duplicado. En el cromatograma, “i” denota incremento y “d” denota disminución.....	35
Figura 3.7 Cultivos control de CORE-2 y CORE-3 en medio TAP.....	37
Figura 3.8 Curva de crecimiento de <i>Coelastrum</i> sp. CORE-2 en medios con diferentes concentraciones de glucosa de melaza pretratada y buffer fosfatos con el control. Donde GB: concentración de glucosa baja (2.5 g L^{-1}), GM: concentración de glucosa media (5.0 g L^{-1}), GA: concentración de glucosa alta (7.5 g L^{-1}), FB: concentración de fosfatos bajo (0.5 mL L^{-1}), FM: concentración de fosfatos medio (1.0 mL L^{-1}), FA: concentración de fosfatos alto (1.5 mL L^{-1}).....	39
Figura 3.9 Curva de crecimiento de <i>Coelastrum</i> sp. CORE-3 en medios con diferentes concentraciones de glucosa de melaza pretratada y buffer fosfatos con el control. Donde GB: concentración de glucosa baja (2.5 g L^{-1}), GM: concentración de glucosa media (5.0 g L^{-1}), FB: concentración de fosfatos bajo (0.5 mL L^{-1}), FM: concentración de fosfatos medio (1.0 mL L^{-1}), FA: concentración de fosfatos alto (1.5 mL L^{-1}).	41

Figura 3.10 Gráfico de superficie en 3D para la respuesta de producción de biomasa, a) CORE-2 y b) CORE-3.	45
Figura 3.11 Producción de lípidos por CORE-2 (barra azul) y CORE-3 (barra naranja) en los diferentes medios de cultivo. Donde GB: concentración de glucosa baja (2.5 g L ⁻¹), GM: concentración de glucosa media (5.0 g L ⁻¹), GA: concentración de glucosa alta (7.5 g L ⁻¹), FB: concentración de fosfatos bajo (0.5 mL L ⁻¹), FM: concentración de fosfatos medio (1.0 mL L ⁻¹), FA: concentración de fosfatos alto (1.5 mL L ⁻¹). El eje Y es la concentración de lípidos en g L ⁻¹ y el eje X son los medios de cultivos usados.....	47
Figura 3.12 Gráfico de superficie en 3D para la respuesta de producción de lípidos, a) CORE-2 y b) CORE-3.....	49
Figura 3.13 Cromatografía de capa delgada de los cultivos control de CORE-2 y CORE-3. STD: aceite vegetal.....	50
Figura 3.14 Cromatografía de capa fina de CORE-2 en los diferentes medios de cultivo.....	50
Figura 3.15 Cromatografía de capa fina de CORE-3 en los diferentes medios de cultivo.....	51

RESUMEN

La crisis energética y el deterioro ambiental son los principales problemas que enfrenta la humanidad debido al aumento de la demanda energética mundial. Los biocombustibles se perfilan como una solución atractiva para enfrentarlos, sin embargo, es necesario la obtención de materia prima renovable con capacidad para satisfacer la demanda de la producción de estos biocombustibles, con bajos costos de producción y alto contenido de compuestos orgánicos. Las microalgas verdes se han destacado por su rápido crecimiento, gran acumulación de lípidos y fácil producción. El género *Coelastrella* ha demostrado que su cultivo con glucosa y un suministro adecuado de fósforo incrementa el contenido de lípidos. La melaza de caña de azúcar es una fuente de carbono atractiva debido a su alto contenido de azúcares y bajo costo. Sin embargo, es necesario un pretratamiento para hidrolizar la sacarosa en monosacáridos (glucosa) y eliminar los compuestos que inhiben el crecimiento celular. Este trabajo se centra en el cultivo de cepas de *Coelastrella* (CORE-1, CORE-2 y CORE-3), empleando melaza como fuente de carbono y suministro de fósforo, para la producción de lípidos. La melaza se pretrató químicamente (HCl 5 N, 120 °C, 15 min, 15 psi). Posteriormente, tres concentraciones de glucosa de melaza (2.5, 5.0 y 7.5 g L⁻¹) y tres concentraciones de fósforo (0.5, 1.0 y 1.5 mL L⁻¹) fueron evaluados para determinar la condición de cultivo adecuada para la producción de lípidos. El pretratamiento incrementó la concentración glucosa de 8.45 a 28.52 g L⁻¹. CORE-1 presentó floculación celular luego del proceso de purificación lo que dificultó su empleo en cultivos posteriores; CORE-2 obtuvo la mejor producción de biomasa seca fresca (5.84 g L⁻¹) y lípidos totales (0.65 g L⁻¹) en un medio con 7.5 g L⁻¹ de glucosa y 1.0 mL L⁻¹ de fósforo; CORE-3 presentó la máxima de producción de biomasa seca fresca (2.52 g L⁻¹) y lípidos totales (0.24 g L⁻¹) en el medio con 5.0 g L⁻¹ de glucosa y 1.0 mL L⁻¹ de fósforo. El análisis por Superficie de Respuesta mostró que la concentración de glucosa presentó mayor influencia en la producción de biomasa y lípidos en comparación con la concentración de fósforo.

ABSTRACT

The energy crisis and environmental degradation are the main problems facing humanity due to the increase in world energy demand. Biofuels are emerging as an attractive solution to face them, however, it is necessary to obtain renewable raw material with the capacity to satisfy the demand for the production of these biofuels, with low production costs and high content of organic compounds. Green microalgae have been noted for their rapid growth, high lipid accumulation, and easy production. The genus *Coelastrella* has shown that its cultivation with glucose and an adequate supply of phosphorus increases the lipid content. Sugarcane molasses is an attractive carbon source due to its high sugar content and low cost. However, a pretreatment is necessary to increase the concentration of simple sugars and eliminate that inhibit cell growth. This work focuses on the cultivation of *Coelastrella* strains (CORE-1, CORE-2 and CORE-3), using molasses as a carbon source and phosphorus supply, for the production of lipids. The molasses was physicochemically pretreated (5N HCl, 120° C, 15 min, 15 psi). Subsequently, three concentrations of molasses glucose (2.5, 5.0 and 7.5 g L⁻¹) and three concentrations of phosphorus (0.5, 1.0 and 1.5 mL L⁻¹) were evaluated to determine the appropriate culture condition for lipid production. The pretreatment increased the glucose concentration from 8.45 to 28.52 g L⁻¹. CORE-1 presented cellular flocculation after the purification process, which made it difficult to use it in subsequent cultures; CORE-2 obtained the best production of biomass (5.84 g L⁻¹) and lipids (0.65 g L⁻¹) in the medium with 7.5 g L⁻¹ of glucose and 1.0 mL L⁻¹ of phosphorus; CORE-3 presented the maximum production of biomass (2.52 g L⁻¹) and lipids (0.24 g L⁻¹) in the medium with 5.0 g L⁻¹ of glucose and 1.0 mL L⁻¹ of phosphorus. The Response Surface Methodology showed that glucose concentration had a greater influence on biomass and lipid production compared to phosphorus concentration.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la sobrepoblación y el uso de hidrocarburos fósiles han llevado a la humanidad a una crisis energética desmedida y un gran deterioro al medio ambiente. El sector de transporte representa hasta el 66% de la demanda energética mundial [1] donde aproximadamente el 93% de su consumo energético está representado por la combustión de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas) [2], añadiendo más de 6 Gton de CO₂ a la atmósfera al año [3]

Los biocombustibles han surgido como una alternativa para hacer frente a estos problemas [4], debido a que contribuyen a la demanda mundial de combustibles, ya que otras energías renovables, como la solar, eólica, mareomotriz y geotérmica, contribuyen a satisfacer la demanda eléctrica [1].

Las microalgas son un grupo de microorganismos capaces de prosperar en ambientes acuáticos y terrestres, y se pueden clasificar de acuerdo a varias características, agrupándose en ocho divisiones, de las cuales las microalgas verdes (Chlorophyta) sobresalen debido a que incluyen a las especies más prometedoras para la producción de biocombustibles [5].

El cultivo de microalgas verdes para la generación de lípidos ofrece muchas ventajas debido a su crecimiento rápido, nulo requerimiento de tierras fértiles y síntesis de moléculas orgánicas a partir de compuestos inorgánicos, por lo que son considerados sumideros de CO₂ atmosférico [6].

Los géneros de microalgas verdes que han sido ampliamente reportados durante los últimos años por su potencial para la producción de lípidos incluyen: *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Chlamydomonas* y *Dunaliella* [7]. El género *Coelastrella* ha comenzado a tomar importancia muy recientemente debido a su termotolerancia [8] y adaptación a cultivos heterotróficos [9].

Se ha comprobado que la adición de glucosa al medio de cultivo aumenta la producción de biomasa y lípidos debido a que es asimilado por la ruta de pentosas fosfato generando más ATP celular [10]. Sin embargo, el cultivo de microalgas heterotróficas con una fuente de carbono pura aumenta los costos de producción en más del 50%, incrementando los costos de la producción de biodiésel [11]. Residuos industriales de bajo costo con alto contenido de carbono orgánico y otros nutrientes disponibles, son una alternativa atractiva para el crecimiento microalgal [12]. La limitación de fósforo también se ha implementado como estrategia para aumentar el contenido de lípidos en microalgas como *Ankistrodesmus falcatus* [13], *Scenedesmus obliquus* [13], *Chlorella ellipsoidea* y *Chlorococcum infusionum* [14], *Chlamydomonas reinhardtii* [10], entre otras, debido a que juega un rol significativo en los procesos metabólicos celulares relacionados con la transferencia de energía, la transducción de señales, la fotosíntesis y la respiración [15]. Se ha reportado que la combinación

de concentraciones elevadas de carbono orgánico con la suministración adecuada de nutrientes, como el fósforo, incrementa la producción de biomasa y lípidos en microalgas [16].

En base a esto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante un diseño experimental el efecto de tres concentraciones de glucosa de melaza pretratada y tres concentraciones fósforo en la acumulación de lípidos en cepas del género *Coelastrrella*.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Microalgas

Las algas son un grupo grande y diverso de organismos acuáticos y son reconocidas como una de las formas de vida más antiguas que han existido en la Tierra. Se consideran plantas primitivas talofitas, ya que carecen de estructuras celulares complejas como raíces, tallos y hojas, las cuales se encuentran en las plantas superiores. Son capaces de crecer en diferentes ambientes y pueden prosperar en agua dulce, salada, salobre e inclusive residuales. Las algas pueden ser pluricelulares (macroalgas) o unicelulares (microalgas), en la Figura 1.1 se muestran algunos representantes de algas y cianobacterias [17, 18].

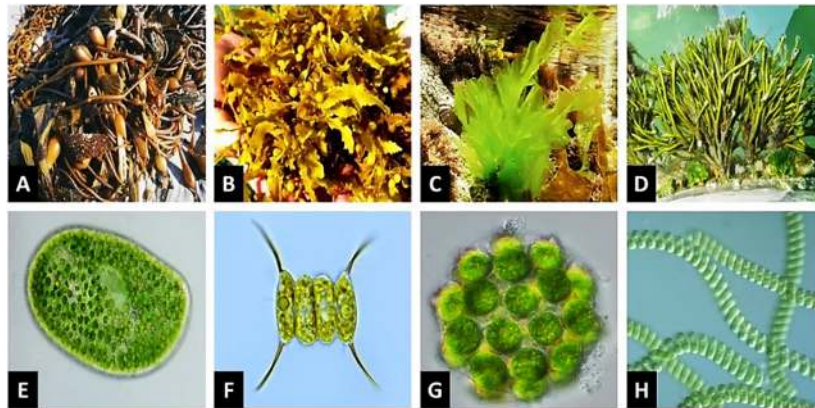


Figura 0.1 Géneros de algas. Macroalgas a) *Macrocystis*, b) *Sargassum*, c) *Ulva* y d) *Codium*; microalgas e) *Chlorella*, f) *Scenedesmus*, g) *Coelastrum* y h) *Spirulina*

Las microalgas son organismos microscópicos (2-200 μm), polifiléticos, fotosintéticos y pertenecientes al reino eucariota.

1.1.1 Clasificación

Existen más de 50,000 especies de algas en el mundo de las cuales solo 4,000 han sido identificadas. Normalmente se clasifican de acuerdo a varias características como: a) presencia o ausencia de núcleos distintos; b) composición y cantidad de diferentes pigmentos fotosintéticos; c) tipo de reserva energética de carbono; d) química de la pared celular; e) presencia o ausencia de flagelos; f) número, tipo, localización y orientación de los flagelos en las células móviles y; g) reproducción e historia de vida [5].

Las microalgas que pertenecen a los filos Bacillariophyta, Chlorophyta y Chrysophyta son las que han destacado en importancia para la producción de biodiesel. Las microalgas verdes (Chlorophyta) incluyen las especies más prometedoras para la producción de este biocombustible [5].

Las microalgas verdes son un grupo formado de células eucariotas y le deben su nombre a la presencia de clorofila-a y clorofila-b. Existen alrededor de 2,650 especies en formas unicelulares, coloniales o filamentosas. Su pared celular es rígida debido a una capa externa de pectosa y una capa interna de celulosa. La mayoría de las especies forman cuerpos de almacenamiento de almidón ubicados en los cloroplastos. Así mismo, sintetizan reservas energéticas en forma de gotas de aceite [5].

1.1.2 Composición bioquímica

Las microalgas contienen tres compuestos orgánicos principales: carbohidratos, proteínas y lípidos, estos últimos representan hasta el 50% del peso seco total. La composición química varía entre cada especie microalgal como se muestra en la Tabla 1.1. Además, contienen otros compuestos, como minerales, ácidos nucleicos, pigmentos, entre otros, que representan un 10% de su composición [7, 21].

Tabla 0.1 Composición bioquímica de microalgas en porcentaje de peso seco [39].

Microalga	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-39
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3

1.1.3 Condiciones operacionales de cultivo

El crecimiento de las microalgas puede ser afectado por algunos parámetros, tales como intensidad de luz, temperatura, pH, agitación, e intercambio de gases, entre otros. Estos parámetros deben ser monitoreados y controlados para tener un mayor rendimiento de biomasa microalgal [21].

A continuación se describen los parámetros que deben ser controlados en el cultivo de microalgas y cómo influyen en su crecimiento.

1.1.3.1 Intensidad lumínica

La intensidad de la luz es uno de los parámetros principales que deben ser considerados para el cultivo de microalgas, debido a que son microorganismos fotosintéticos. Cuando los cultivos son expuestos a diversas intensidades de luz se producen cambios notorios en su composición química general, pigmentación y actividad fotosintética [22].

La actividad fotosintética aumenta con el incremento de la intensidad lumínica. La tasa de crecimiento fotosintético celular es la capacidad que tiene una microalga de captar fotones y depende de la cantidad de energía luminosa que recibe cada célula. Cuando las microalgas reciben una intensidad de luz alta y continua, alcanzan la tasa máxima de crecimiento, la cual es una constante específica para cada especie e indica el nivel de energía lumínica a la cual el fotosistema de un microorganismo comienza a saturarse [21].

Cuando la energía incidente proveniente de la intensidad lumínica rebasa el límite máximo de saturación se alcanza el punto de fotoinhibición de los fotosistemas, lo que resulta en daños celulares y hasta la muerte, implicando pérdida de productividad del cultivo debido a la pérdida de eficiencia fotosintética [23].

1.1.3.2 Temperatura

La temperatura óptima varía entre especies, pero generalmente se encuentra entre 28° y 35°C. Muchas especies de microalgas son capaces de tolerar hasta 15°C menos de la temperatura óptima, sin embargo, un aumento de 2° a 4°C por encima de niveles adecuados provoca un aumento en la respiración y la fotorrespiración, reduciendo la productividad global y hasta pérdida parcial o total del cultivo. La temperatura es un parámetro muy bien documentado en cultivos de laboratorio, pero en cultivos exteriores aún no se conoce bien el efecto que tiene sobre el rendimiento de biomasa [23, 24].

1.1.4 Agitación y densidad celular

La función principal de la agitación es evitar la sedimentación y permitir que todas las células del cultivo accedan a las zonas iluminadas en el fotobiorreactor, además promueve el intercambio de gases, la homogenización de nutrientes y la distribución de calor. Existen muchas formas de inducir la agitación en un cultivo, siendo el más usado en la producción a gran escala el sistema de aireación por columnas de burbujeo o *airlift*, debido a su sencillez y porque evita daño mecánico a las células. La turbulencia generada por el sistema de agitación promueve la circulación homogénea de las

microalgas, sin embargo, un alto grado de turbulencia pueden provocar daño a las microalgas debido a la tensión de cizallamiento. La fragilidad celular y el nivel óptimo de turbulencia son factores que limitan la intensidad de agitación en un cultivo y pueden variar entre especies, por lo que deben investigarse para evitar la disminución en la productividad [21, 24].

1.1.4.1 Salinidad

Al igual que los parámetros anteriores el intervalo óptimo de salinidad varía entre cada especie microalgal. Este factor afecta el crecimiento y composición bioquímica celular. Hay tres maneras en las que los cambios de salinidad afectan a las microalgas: 1) estrés osmótico, 2) estrés iónico y 3) cambios en las relaciones iónicas celulares debido a la permeabilidad selectiva de la membrana a los iones. La manera más sencilla de controlar este parámetro es agregar agua dulce o la adición de sal al medio de cultivo cuando sea necesario [24].

1.1.4.2 Oxígeno disuelto

El oxígeno producido por las microalgas durante la actividad fotosintética puede acumularse en el cultivo y aumentar los niveles de oxígeno disuelto hasta la saturación ($>200\%$), lo que podría afectar su productividad e incluso inhibir su crecimiento, ya que si éste aumenta hasta un 300% el rendimiento del cultivo disminuye hasta un 25%. Este problema puede ser resuelto con un sistema de agitación, ya que favorece la transferencia del O_2 a la atmósfera disminuyendo su concentración en el medio [21, 23].

1.1.4.3 pH

El pH determina la solubilidad de CO_2 y de los minerales en el medio de cultivo, y es influenciado por la actividad metabólica microalgal, alcalinidad y composición iónica del medio y la adición de CO_2 . El pH también actúa sobre la solubilidad de los compuestos metálicos. Un incremento de este puede provocar una deficiencia de algunos metales traza. Así mismo, la actividad fotosintética de las microalgas genera cambios en el pH, por lo que si éste aumenta hasta 9 puede provocar que elementos como el carbonato precipiten dificultando su disponibilidad. Como muchos otros parámetros, el pH óptimo varía entre cada especie, pero generalmente un pH 8 es el más indicado, sobre todo para especies de agua dulce. Un aumento o disminución de éste puede provocar descenso en la productividad e inhibición algal. Una forma de controlar el pH es mediante la inyección de CO_2 o la adición de soluciones ácidas o alcalinas, según sea el caso [21, 23].

1.1.5 Nutrientes

El medio en el que crecen las microalgas debe contener los nutrientes suficientes para su crecimiento y desarrollo, y están directamente involucrados en la síntesis de biomoléculas, producción de energía,

formación de pigmentos y soporte estructural (Tabla 1.2). Estos nutrientes están agrupados en dos categorías: 1) micronutrientes (elementos traza) requeridos en dosis bajas (mg L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1}) y; macronutrientes: requeridos en grandes concentraciones en el medio de cultivo (g L^{-1}) [21, 25].

Tabla 0.2 Macro y micronutrientes esenciales para el cultivo de microalgas [2, 44].

Elemento	Compuesto	Función
C	CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}	Aportar energía a la célula
H	H_2O	Transferencia de electrones en la fotosíntesis
N	NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-	Regulación de síntesis de proteínas y metabolitos intracelulares
Na	NaCl , Na_2SO_4 , Na_3PO_4	Mantenimiento y estructura de la membrana
K	KCl , K_2SO_4 , K_3PO_4	Síntesis de proteínas y regulación osmótica
Ca	CaCl , CaCO_3	Formación de la membrana celular y estructura de lípidos
P	Fosfatos de Na y K	Síntesis de proteínas y fosfolípidos y transferencia de energía
S	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, o aminoácidos	Síntesis de aminoácidos, coenzimas y compuestos de la pared celular
Mg	Sulfatos o cloruros de Mg	Síntesis de clorofila, transferencias de fosfatos y metabolismo de carbohidratos y N
Cl	Sales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o NH_4^+	Regulación de presión osmótica y equilibrio iónico
Fe	Sales de EDTA	Reacciones de óxido-reducción y síntesis de clorofila
Zn	ZnSO_4 , ZnCl_2	Síntesis y estructura del ADN y activador de coenzimas
Mn	MnSO_4 , MnCl_2	Respiración y metabolismo del N y activador de coenzimas
B	H_3BO_3	Metabolismo del N y fotosíntesis
Mo	Sales de Mo de Na^+ o NH_4^+	Fijación, asimilación y reducción del N
V	$\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	Coenzimas
Cu	Sulfatos o cloruros	Absorción de CO_2 en la fotosíntesis
Co	Vitaminas B_{12} , sulfatos o cloruros	Síntesis y estructura del ADN

1.1.5.1 Micronutrientes

También son llamados elementos traza y, a diferencia de los macroelementos, son incorporados al medio de cultivo en concentraciones muy pequeñas que van de miligramos hasta nanogramos por litro, ya que en altas concentraciones inhiben el crecimiento celular y la síntesis de clorofila, lo que conlleva a cambios en la actividad fotosintética. Entre los micronutrientes esenciales para el cultivo de microalgas se encuentran el hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), níquel (Ni), boro (B), vanadio

(V), cobalto (Co), cobre (Cu), molibdeno (Mo), selenio (Se), magnesio (Mg) y calcio (Ca), y generalmente actúan como precursores de vitaminas y como coenzimas en varias rutas metabólicas [26, 27].

La influencia de ciertos parámetros puede afectar el requerimiento de micronutrientes por la microalga. Por ejemplo: 1) la calidad e intensidad de luz y el fotoperíodo intervienen en los requisitos de Fe y Mn debido a que ambos están involucrados en la síntesis de clorofila; 2) la forma nitrogenada del N (NH_4^+ , NO_3^- , o urea) influye en la necesidad de Fe y Mo debido a sus reacciones redox en la asimilación del N; 3) la absorción de CO_2 influye en el suministro de Zn y Co ya que son indispensables en la síntesis del ADN y actúan como coenzimas en rutas metabólicas; 4) la asimilación del P influye en la demanda de Zn debido a su papel en la activación de isoenzimas en la fosforilación [2, 25].

La nutrición del cultivo también influye en el requerimiento de los micronutrientes, ya que se ha reportado que *Chlorella pyrenoidosa* necesita mayores requerimientos de Mn, Fe y Zn cuando es cultivada en condiciones de autotrofia, mientras que en condiciones de heterotrofia requiere mayores concentraciones de Mg y K [28]. Los micronutrientes interactúan entre ellos en una gran cantidad de reacciones metabólicas y pueden tener la misma función. Tal es el caso de la síntesis del etileno por *Haematococcus pluvialis*, ya que es estimulado por Co^{2+} y Mn^{2+} , sin embargo, es inhibido por Cu^{2+} , pero Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} no le afectan [25].

1.1.5.2 Macronutrientes

Son aquellos elementos que le aportan al cultivo la mayor parte de la energía metabólica para su división celular y la formación de metabolitos intracelulares. Estos elementos se suministran en grandes cantidades, para su absorción e incorporación a carbohidratos, lípidos y proteínas. El metabolismo de éstos está interrelacionado, por lo que la disminución o privación de alguno de ellos puede interferir con el crecimiento de la célula, como es el caso del nitrógeno, fósforo, azufre y carbono [25, 29, 30].

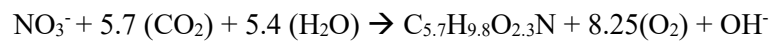
1.1.5.2.1 Nitrógeno

El nitrógeno (N) es uno de los elementos esenciales para el cultivo de microalgas ya que forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y aminoácidos. Tiene la función de regular la síntesis de proteínas y la producción de metabolitos involucrados en el crecimiento celular. Las microalgas asimilan el N en forma de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+) y algunas especies son capaces de utilizar fuentes orgánicas de N como la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), extractos de levadura, triptona y algunos aminoácidos como glicina, serina, alanina y lisina, entre otros [21, 23].

El NH_4^+ es la forma de N preferida para muchas microalgas, ya no requiere una reacción redox para su asimilación lo que se refleja en un menor costo energético y puede incorporarse directamente en la formación de aminoácidos. Sin embargo, se ha reportado que concentraciones mayores a $25 \mu\text{M}$ es tóxico para algunas microalgas, por lo que el NO_3^- es principalmente usado en medios de cultivos sintéticos como BG-11 y Bold Basal [25].

Cuando el N es incorporado al medio en forma de NO_3^- ocurren dos reacciones de reducción, la primera ocurre en el citosol, catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR), la cual reduce el NO_3^- a NO_2^- , donde una fracción de NO_2^- es liberado al medio acuoso y otra fracción es captada en los cloroplastos para ser nuevamente reducida por la nitrito reductasa (NiR) hasta la formación de NH_4^+ , donde finalmente puede integrarse a compuestos orgánicos. La actividad y síntesis de las enzimas involucradas en este proceso está fuertemente ligada a la intensidad y calidad de luz que recibe la célula [21, 25].

El pH del medio es afectado por el consumo de N en el medio. La absorción de 1 mol de NO_3^- libera 1 mol de OH^- , reflejándose en un aumento del pH, como se muestra en la siguiente reacción:



Por otro lado, la asimilación de 1 mol de NH_4^+ produce 1 mol protones de hidrógeno (H^+), disminuyendo el pH a valores inferiores a 6.0. La reacción que describe este proceso es la siguiente:



El consumo de NO_3^- y NH_4^+ afectan el nivel del pH del medio por lo que se debe considerar el ajuste del pH, si las microalgas son cultivadas en medio nutritivo sintético, ya que un pH ácido produce inhibición en el crecimiento celular [26].

1.1.5.2.2 Azufre

El azufre (S) es un nutriente clave en los procesos celulares, ya que está involucrado en la síntesis de aminoácidos azufrados, como cisteína, cistina y metionina, síntesis de sulfolípidos de la membrana celular, compuestos de la pared celular, síntesis de compuestos tiol, vitaminas, coenzimas y tioésteres. Así mismo, el S tiene un rol importante en la formación de enlaces disulfuros que proporcionan estructura a las proteínas. Debido a que la mayoría de los organismos tienen solo un suministro limitado de S presente en aminoácidos como glutatión, centros sulfoferricos, y diversas coenzimas y vitaminas, su crecimiento y desarrollo dependen de un suministro continuo de este nutriente del medio ambiente [2, 25].

Los seres vivos, asimilan el S en forma de sulfatos como SO_4^{2-} , pero en el medio ambiente el SO_4^{2-} inorgánico no se encuentra disponible comúnmente, ya que la concentración de S en el suelo no suele superar 1-15%, debido principalmente a que el S se une covalentemente con algunas moléculas orgánicas. Por su parte, se ha confirmado que las microalgas son capaces de utilizar otras fuentes de S como aminoácidos azufrados, ácidos sulfinicos, ácidos sulfónicos, ésteres de sulfato, tioéteres, sulfóxidos y disulfuros, entre otros. Al igual que los NO_3^- y NO_2^- , el SO_4^{2-} debe ser reducido antes de incorporarse a los compuestos orgánicos mediante la fosforilación. Este proceso metabólico está regulado por mecanismos transcripcionales, postranscripcionales e interacciones proteína-proteína. Ante la disminución de S, las células tienen la capacidad de expresar una serie de genes para modificar su fisiología y adaptarse a la nueva concentración [25].

1.1.5.2.3 Fósforo

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para un crecimiento normal en todas las especies de microalgas, debido a su rol en la regulación de la mayoría de los procesos metabólicos celulares como la biosíntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, en la modificación de proteínas, así como en la transferencia de energía a través de la formación de trifosfato de adenosina (ATP). A pesar de que el P representa menos del 1% del contenido total de las microalgas su deficiencia genera limitaciones en el crecimiento [21, 23].

Las microalgas asimilan el P en forma de fosfatos (PO_4^{3-}), ya que de encontrarse en otras formas orgánicas o inorgánicas primero deben ser mineralizadas y convertidas en ortofosfatos para poder ser asimilados, este proceso es realizado por fosfatasas extracelulares [25, 29].

El PO_4^{3-} es asimilado a partir de H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} mediante el proceso de fosforilación, una parte del PO_4^{3-} captado, es incorporado en compuestos orgánicos y otra es usada para la generación ATP a partir difosfato de adenosina (ADP) para suministrar energía a la célula [23, 26].

El pH mantiene una relación con el P y su disponibilidad en el medio de cultivo, ya que en ambientes ácidos o alcalinos afectan disminuyendo su absorción. En cultivos alcalinos (pH entre 9 y 11), el PO_4^{3-} reacciona con el Ca^{2+} y precipita formando fosfato de calcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], lo que dificulta su asimilación. Así mismo, la adsorción del P en la pared celular de las microalgas es otro problema relacionado con el aumento del pH [26].

Estudios han mostrado que bajo condiciones de concentración suficiente de P se induce un incremento en el contenido de lípidos [15]. Shen *et al.* [13] cultivaron a *Scenedesmus obliquus* NIES-2280 con acetato como fuente de carbono con deficiencia de N y limitación de P, reportaron que la célula asimila eficientemente el acetato para la acumulación de lípidos y el contenido de ácidos grasos

aumentó a 38-48% cuando hay deficiencia de N y la productividad de FAME mejoró cuando el medio de cultivo tenía una concentración suficiente de P, en lugar de limitarlo o privarlo. Satpati *et al.* [14] evaluaron a *Chlorella ellipsoidea* y *Chlorococcum infusionum* bajo condiciones de estrés con EDTA y privación de P, como resultado obtuvieron que el contenido de lípidos aumento tres veces en *C. ellipsoidea* (41.8 %) y el doble en *C. infusionum* (31.3%) cuando hubo deficiencia de P. Karpagam *et al.* [10] evaluaron la producción de biomasa, la productividad de lípidos y el contenido de lípidos en *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada en deficiencia de N y P, administración de glucosa (0.05%, 0.1%, 0.15% y 0.2%) y vitamina 12 (0.001%, 0.002% y 0.003%), el contenido de lípidos aumentó en el medio con deficiencia de P (TAP P⁻, 27.9%) en comparación con el control (TAP, 23.8%), sin embargo, la limitación de N (TAP N⁻) tuvo mejores resultados (61%).

1.1.5.2.4 Carbono

El carbono (C) es el macronutriente más importante en el cultivo de microalgas, ya que es el responsable de aportar energía que requiere la célula para su crecimiento. La biomasa microalgal consiste en un 40-50% de C y de acuerdo a la disposición de este elemento las microalgas puede optar por diferentes tipos de metabolismo [24].

Fotoautotrófico: Naturalmente, las microalgas captan la radiación solar y asimilan el CO₂ presente en la atmósfera (contiene 360 ppmv de CO₂) para convertirlo en biomasa y moléculas orgánicas mediante el proceso de fotosíntesis. Así mismo, pueden asimilar el CO₂ proveniente de gases industriales y de carbonatos solubles [18].

Heterotrófico: Utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono tales como: glucosa, acetato, glicerol o fructosa. Debido a que obtienen la energía directamente de estas fuentes, no requieren luz para para su crecimiento, por lo que pueden cultivarse en oscuridad [21, 24].

Mixotrófico: En este tipo de cultivo, las microalgas son capaces de asimilar carbono en forma orgánica e inorgánica y realizar la fotosíntesis. En este tipo de cultivos generalmente se obtienen altas tasas de crecimiento y productividad de biomasa [2, 29].

El C también afecta los niveles de pH en el medio, ya que éste tiende a aumentar cuando el cultivo tiene iones carbonato (HCO₃⁻) para obtener CO₂. En este caso la disociación de HCO₃⁻ proporciona a la célula el carbono necesario para su crecimiento, lo que propicia la acumulación de iones hidroxilos (OH⁻) en el medio y por ende un aumento en el pH [26]. La reacción involucrada es la siguiente:



En los cultivos de microalgas, el pH es controlado debido al equilibrio químico existente entre las fuentes de C inorgánico. Cuando el CO₂ proviene de la disociación de ácido carbónico (H₂CO₃), bicarbonatos (HCO₃⁻) o carbonatos (CO₃²⁻), el valor del pH se mantiene entre 6.36 y 10.33 debido al sistema de amortiguamiento de carbonato-bicarbonato [26].

Se ha demostrado que la adición parcial de glucosa al medio como fuente de carbono aumenta la productividad de biomasa microalgal y lípidos, debido a que la glucosa promueve la donación de electrones a través del sistema de transporte de electrones (STE) lo que consecuentemente proporciona energía a la célula para la síntesis de compuestos orgánicos. Sin embargo, el cultivo de microalgas heterotróficas a través de una fuente de carbono, aumenta los costos de producción del biodiésel en más de un 50%, haciendo el proceso inviable económicamente [10, 11].

Una forma de solucionar este inconveniente es mediante el suministro de materiales residuales de bajo costo y ricos en carbono orgánico que suministren a la célula, los nutrientes necesarios para su crecimiento, siendo la melaza residual de la caña de azúcar, una de las fuentes de carbono más prometedoras en el cultivo de microalgas heterotróficas para la producción de biodiesel debido a sus altas concentraciones de sacarosa y otros nutrientes esenciales como el nitrógeno [12, 31].

1.2 Melaza

La industria azucarera procesa anualmente cerca de 1.8 mil millones de toneladas de caña de azúcar alrededor del mundo para producir más de 250 millones de toneladas de azúcar, 250 millones de toneladas de fibra residuales y 40 millones de melaza [32].

La melaza es un subproducto de la industria azucarera de bajo valor monetario, de textura densa, viscosa, de color marrón oscuro y con pH es ácido (entre 5.5 y 6.5) influenciado por su alto contenido de metales pesados; además presenta una alta demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (BQO) [33, 34].

La melaza está compuesta por agua, proteínas, vitaminas, aminoácidos y metales pesados como Fe, Zn, Cu, Mn, Ca, entre otros. Además, más del 40% de su peso húmedo está compuesto por azúcar como sacarosa, y en menor medida por glucosa y fructosa (Tabla 1.3) [35, 36]. El alto contenido de carbono en la melaza la perfila como una materia prima atractiva y de bajo costo para la producción de biodiésel a partir de microalgas oleaginosas [12].

Tabla 0.3 Principales características de la melaza de caña de azúcar [34].

Componente	Unidad	Cantidad
Grados Brix	°Bx	79.5
Gravedad específica	-	1.41
Sólidos totales	%	75.0
Azúcares totales	%	46.0
Proteína cruda	%	3.0
Extracto de N libre	%	63.0
Cenizas	%	8.1
Ca	%	0.8
P	%	0.08
K	%	2.4
Na	%	0.2
Cl	%	1.4
S	%	0.5
Cu	mg kg ⁻¹	36
Fe	mg kg ⁻¹	249
Mn	mg kg ⁻¹	35
Zn	mg kg ⁻¹	13
Biotina	mg kg ⁻¹	0.36
Colina	mg kg ⁻¹	745
Ácido pantoténico	mg kg ⁻¹	21.0
Riboflavina	mg kg ⁻¹	1.8
Tiamina	mg kg ⁻¹	0.9

La melaza debe ser sometida a pretratamiento para hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa, las formas de asimilación de carbono para las microalgas.

El pretratamiento también incluye la remoción de iones metálicos, como Cu²⁺, debido a que inhiben el crecimiento celular, afectan el pH del sustrato y están involucrados en la inactivación de enzimas asociadas a la biosíntesis de productos [11, 33, 37].

Estudios de cultivos microalgales de *Micractinium* sp. [31], *Chlorella* sp. [12], *C. protothecoides* [34], *C. zofingiensis* [36], *C. sorokiniana* [38] y *C. pyrenoidosa* [11] han revelado que la adición de melaza al medio de cultivo aumentó la producción de biomasa y triacilgliceridos. Sin embargo, la evaluación de melaza como fuente de carbono en cultivos de *Coelastrella* no ha sido reportada al

momento, siendo que este género destaca por su capacidad termotolerante y adaptación a cultivos heterotróficos para la producción de biodiésel [1, 9].

1.3 *Coelastrella*

El género *Coelastrella* pertenece al grupo de microalgas verdes cocoides (sin movimiento) de la familia Scenedesmaceae. Esta es la familia de microalgas verdes más grande que existe, ya que cuenta con 54 géneros, lo que puede complicar su clasificación taxonómica [39].

A continuación se muestra la clasificación del género *Coelastrella* por Lakshmana *et al.* [40].

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Filo: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Sphaeropleales

Familia: Scenedesmaceae

Género: *Coelastrella*

Generalmente el género *Coelastrella* tiene una forma celular elipsoidal u ovalada, con pared celular esculpida con costillas meridionales bien pronunciadas y de organización unicelular. Su estructura es similar a la de *Scotiella*, *Scotiellopsis* y *Graesiella* [41].

Este género ha sido aislado de diversas regiones como: Yucatán, México [39]; Tamil Nadu, India [1]; Hunan, China [42]; Shizuoka, Japón [43]; Kaohsiung, Taiwán [44]; Nueva York, Estados Unidos [45]; Victoria, Australia [46]; Umeå, Suecia [47]; Neuherberg, Alemania [48]; Oviedo, España [49]; Tirol, Austria [50]; Moscú, Rusia [51] y Bogor, Indonesia [52].

1.3.1 Biosíntesis de lípidos por *Coelastrella*.

Karpagam *et al.*[53] secuenciaron y analizaron el genoma de *Coelastrella* sp. M-60 para conocer las proteínas involucradas en la biosíntesis de lípidos. De esta manera se identificó a acetil CoA carboxilasa, malonil CoA:ACP transferasa, subunidades de ácido graso sintasa y acil-CoA tioesterasa. Así también, enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos neutros especialmente triacilglicerol (TAG): como glicerol-3-fosfato aciltransferasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa,

ácido lisofosfatídico aciltransferasa, ácido fosfatídico fosfatasa, diacilglicerol cinasa y diacilglicerol acil transferasa. Las enzimas identificadas son coincidentes a las encontradas en otras microalgas oleaginosas como *Coccomyxa subellipsoidea*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella variabilis* [53].

La biosíntesis de lípidos y ácidos grasos en *Coelastrella* ocurre de manera similar como en otras microalgas verdes. Sin embargo, la investigación del metabolismo de microalgas es fragmentario y, a diferencia de las plantas terrestres, las rutas bioquímicas involucradas han sido poco estudiadas. Aunque estudios indican que plantas y algas, comparten secuencias genéticas similares implicadas en rutas metabólicas básicas para la biosíntesis de ácidos grasos y TAG [22].

La biosíntesis de lípidos en microalgas –incluido el género *Coelastrella*– inicia mediante el proceso fotosintético (Figura 1.2), en el cuál la energía obtenida de los fotones capturados es utilizada por el PSII en la oxidación catalítica del agua, para liberar protones (H^+), electrones (e^-) y oxígeno molecular (O_2). Los electrones son transportados a través del sistema de transporte de electrones (STE) para la producción de moléculas de NADPH mediante la reducción de la ferredoxina. Un gradiente electroquímico es generado dentro de la membrana tilacoidal debido a la liberación de protones después de la fase de oxidación del agua. Este gradiente es empleado para la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa. Las moléculas de NADPH y ATP formadas durante el procesos de fotosíntesis sirven de sustrato para el ciclo de Calvin, en el cual la enzima Rubisco cataliza la conversión de CO_2 y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, donde posteriormente serán convertidas en piruvato y acetil-CoA [4].

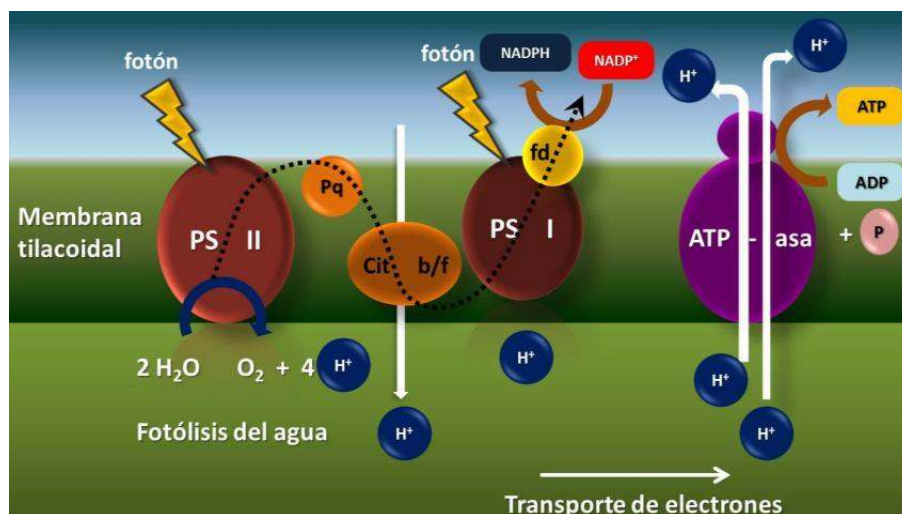


Figura 0.2 Esquema de la fotosíntesis por microalgas [54].

La síntesis de ácidos grasos en las microalgas ocurre principalmente en los cloroplastos (Figura 1.3). Generalmente se obtienen moléculas de ácidos grasos de 16- y/o 18- carbonos, los cuales son usados

como precursores para la síntesis de cloroplastos, moléculas de la membrana celular y lípidos neutros de almacenamiento como los TAGs. El primer paso comienza en la conversión de la molécula de acetil-CoA a malonil-CoA por la enzima acetil-CoA carboxilasa. Las moléculas de acetil-CoA provienen de una reserva provista por la fotosíntesis en los cloroplastos y existe más de una ruta metabólica que contribuye al mantenimiento de esta reserva. La molécula de malonil-CoA tiene la función principal de donar C para la síntesis de ácidos grasos. Posteriormente la enzima malonil CoA:ACP transferasa transfiere el grupo malonil del CoA a un cofactor proteico ACP y se obtiene malonil-ACP, la cual participa en una serie de reacciones de condensación con los aceptores de acil ACP o acetil CoA. La primera reacción de condensación es catalizada por la enzima 3-cetoacil-ACP sintasa III para la formación un compuesto de cuatro carbonos llamado 3-cetoacil-ACP. Después de cada reacción de condensación ocurren tres reacciones adicionales. Para formar un ácido graso saturado el 3-cetoacil-ACP es reducido por la enzima 3-cetoacil-ACP reductasa, posteriormente es deshidratado por la hidroxiacil-ACP deshidratasa y nuevamente reducido por la enoil-ACP reductasa. Para la producción de un ácido graso insaturado, la enzima esteroil-ACP desaturasa agrega un doble enlace. La síntesis de los ácidos grasos finaliza cuando la enzima tioesterasa acil-ACP remueve e hidroliza el ACP liberando los ácidos grasos libres en el cloroplasto [22, 55].

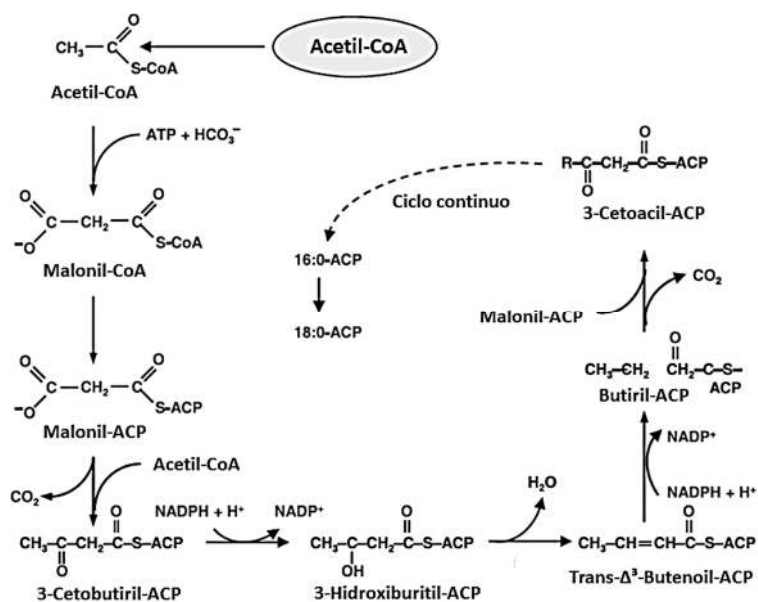


Figura 0.3 Esquemización de la biosíntesis de ácidos grasos en microalgas realizada en los cloroplastos [38].

Por último, la síntesis de TAG es realizada en el retículo endoplasmático (Figura 1.4), específicamente en los cloroplastos, en el cual se producen lípidos neutros para el almacenamiento. Para la síntesis de TAG, la primera reacción producida es la acilación de moléculas de glicerol-3-fosfato con una de acil-CoA, para la formación de ácido lisofosfatídico, catalizada por la enzima acil-

CoA: glicerol-sn-3-fosfato acil-transferasa y otra molécula de acil-CoA para producir ácido lisofosfatídico. Seguidamente ocurre la desfosforilación del ácido fosfatídico (PA) por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa para formación de diacilglicerol. Finalmente, la enzima diacilglicerol-transferasa incorpora un tercer grupo acil-CoA a la molécula de diacilglicerol para la formación de TAG. Los TAG sintetizados son almacenados en aceites, los cuales posteriormente serán extraídos para la producción de biodiesel [4, 56, 55].

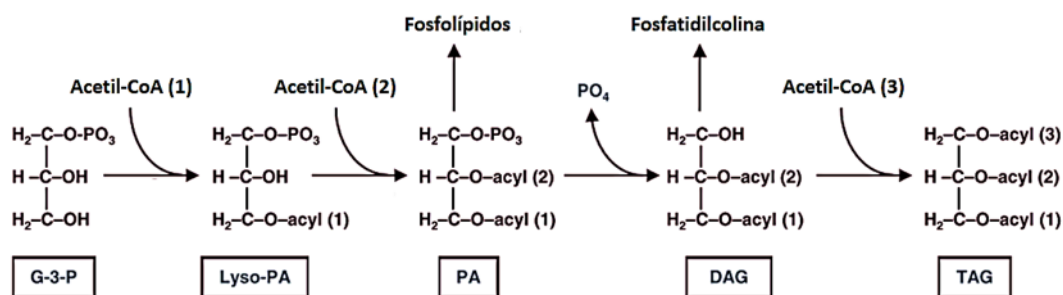


Figura 0.4 Esquemización simplificada de la biosíntesis de TAGs en microalgas [38].

1.3.2 Producción de lípidos por *Coelastrella*

Se ha demostrado que algunas cepas de *Coelastrella* tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos cuando son sometidas a condiciones de estrés y adición exógena de glucosa, lo que sugiere que es candidato para la producción de biodiésel [9].

Minyuk *et al.* [51] estudiaron el efecto del pH y enriquecimiento de CO_2 en la síntesis de lípidos y composición de ácidos grasos en *Coelastrella rubescens*. Determinaron que la productividad máxima de lípidos fue de $147 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en el cultivo a pH 8. Sin embargo, el índice de insaturación de ácidos grasos (1.851), el porcentaje de ácidos grasos insaturados (36-39%) y la relación de C18:3 ω 3/C18:1 ω 9 (3.8 – 4.5) fueron mayores a pH 6 y 7. El cultivo a pH 5, presentó severas condiciones de estrés para el cultivo, reflejado en un cese de la división celular, reducción de la actividad del aparato fotosintético y un declive considerable en el contenido de ácidos grasos insaturados. Por otro lado, el cultivo de *C. rubescens* sin enriquecimiento de CO_2 mostró una rápida alcalinización del medio (de 9.5 a 10.5)

Ferro *et al.* [57] aislaron 62 cepas de microalgas de aguas frescas y residuales del norte de Suecia y evaluaron su capacidad para crecer en aguas residuales municipales, remoción de N y F y acumulación de lípidos. Fueron cultivadas en un fotobiorreactor con aguas residuales municipales por dos semanas, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y luz continua de $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La cepa *Coelastrella* sp. SAG 2123 presentó un contenido de lípidos de 30.80% y una concentración de biomasa de 1.46 g L^{-1} . Así mismo

presentó una eficiencia de remoción de N >90% y de P > 99%, lo cual sugiere su potencial uso para el tratamiento de aguas residuales y acumulación de lípidos.

Neofotis *et al.* [45] aislaron y caracterizaron 28 cepas de microalgas para la producción de biocombustibles y bioproductos. Seis de las 28 cepas fueron identificadas dentro del género *Coelastrella*. Las cepas DOE0088 y DOE0202 presentaron un contenido de lípidos de 17% y 23%, respectivamente, a las 180 horas de cultivo. Sin embargo, debido a las gruesas paredes celulares de las cepas, la extracción de lípidos parecía ineficiente debido a la tonalidad verde de la biomasa residual, por lo que los contenidos lipídicos totales probablemente fueron subestimados. Las cepas DOE0088, DOE0202 y DOE0369 mostraron mayor porcentaje de ácidos grasos C:18 y una alta tasa de crecimiento mostrando su potencial para la producción de biocombustibles.

Suriya *et al.* [1] evaluaron la cepa (FI69) termotolerante de *Coelastrella* sp. aislada de un lago seco para estudiar su crecimiento y resistencia a la temperatura. En condiciones de cultivo en fotobiorreactor en columna de burbujeo y en condiciones abiertas. El cultivo fue agitado mediando el suministro de aire enriquecido con CO₂ en concentraciones de 0.04%, 1.5% y 5.0% v v⁻¹ a una velocidad de 4.4 v v⁻¹ m⁻¹ por seis horas al día durante ocho días. El cultivo enriquecido con 1.5 % v v⁻¹ de CO₂ presentó los mejores resultados de crecimiento: producción máxima de biomasa de 3.540 ± 0.14 g L⁻¹ con aproximadamente 18% de peso seco de lípidos totales, de los cuales 31.43 % son C18:1, siendo un precursor deseable para la producción de biodiésel. El contenido energético de la biomasa fue de aproximadamente 21 MJ kg⁻¹. Además, la cepa fue capaz de tolerar temperaturas de entre 30 y 55 °C.

Li *et al.* [37] estudiaron la capacidad de *Coelastrella* sp. para la eliminación de compuestos orgánicos de aguas residuales de industrias porcícolas digeridos anaeróbicamente, así como su respuesta al estrés por Cu²⁺ en concentraciones de 0.0, 0.10, 0.50, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹ para la producción de biodiésel. Entre sus resultados obtenidos encontraron que una concentración > 1.0 mg L⁻¹ de Cu²⁺ en el cultivo de *Coelastrella* sp. incrementa la producción de ácidos grasos (C16:0, C18:3 y C18:2), lo que favorece la producción de biodiésel. Sin embargo, cuando la concentración de Cu²⁺ fue de 2.0 y 3.0 mg L⁻¹, C18:3 desapareció, C16:0 aumentó de 43.3% a 57.8% y C18:1 aumentó de 34.4% a 41.2%. Esto indica que Cu²⁺ podría incrementar el grado de saturación de C18 y C16.

Dimitrova *et al.* [8] evaluaron el efecto de dos intensidades de iluminación (unilateral baja y bilateral alta) y un intervalo de temperatura de entre 20 y 40 °C, en la composición lipídica de *Coelastrella* sp. BGV. La fuente de carbono fue provista por burbujeo de aire enriquecido con 2 % v v⁻¹ de CO₂. Los resultados mostraron que, para la iluminación bilateral alta, el mayor contenido de lípidos fue de 37%

a 25 °C, mientras que el más bajo fue de 10.3% a 40 °C. Sin embargo, a 44 °C con iluminación unilateral baja el contenido de lípidos fue de 40%. Los principales ácidos grasos sintetizados por esta cepa fueron C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y C α -18:3.

Luo *et al.* [42] estudiaron el crecimiento, remoción de nutrientes y acumulación de lípidos de *Coelastrella* sp. QY01 en el tratamiento de aguas residuales porcinas tratadas aerobia y anaeróbicamente. Sus resultados mostraron que las tasas de remoción de NH₃-N, TP y C inorgánico fue de 90-100 %, 90-100 % y 74-78 %, respectivamente. El intervalo de velocidad específica de crecimiento fue de 0.269 a 0.325 día⁻¹, la productividad de biomasa fue de 42.77 a 57.46 mg L⁻¹ día⁻¹. El contenido de lípidos fue de 22.4 a 24.8 %, resultando en una correlación positiva con la productividad de biomasa. El contenido de ácidos grasos consistía principalmente de C16:0, C18:2 y C18:3, en concentraciones de 23.8–30.8 %, 11.9–20.8 % and 40.5–53.8 % del total de ácidos grasos, respectivamente. El análisis del perfil lipídico mostró un alto contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente C16:3, C18:2 y C18:3.

Karpagam *et al.* [9] evaluaron *Coelastrella* sp. M-60 para la producción de biodiésel, limitación de nutrientes (N, P y Fe), estrés osmótico y suministro de carbono mediante efluentes provenientes de la industria de caña de azúcar, ácido cítrico, glucosa y vitamina B₁₂ para aumentar los rendimientos de biomasa y lípidos. El estrés osmótico mediante adición de 2% de NaCl al medio de cultivo presentó los mejores resultados de rendimiento, ya que la productividad lipídica fue de 13.9 ± 0.4 mg L⁻¹ día⁻¹. Los principales ácidos grasos detectados fueron C16:0, C16:1, C18:1 y C18:2, los cuales tienen estabilidad a la oxidación. Los autores de esta investigación emplearon la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés de *response surface methodology*), debido a que es uno de los métodos más adecuados y eficientes para estudiar el efecto combinado de diversas condiciones de cultivo en la producción de lípidos en microalgas. Por lo que es uno de los mejores métodos para lograr la optimización en las condiciones de cultivo.

1.4 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La MSR es una estrategia experimental que permite resolver la problemática de hallar las condiciones óptimas de operación en un proceso, para que este dé por resultados “valores óptimos” de una o varias características en la calidad de un producto. Esta técnica tiene como objetivo principal diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la respuesta, y posteriormente, determinar un modelo matemático que se ajuste a los valores obtenidos [58].

En el cultivo de microalgas, esta metodología ha sido empleada para obtener el mejor rendimiento en la producción de lípidos, ajustando variables como la temperatura, el solvente de extracción, el tipo de fuente de carbono, condiciones de estrés, concentración de nutrientes, entre otros.

Alam *et al.*, [59] emplearon esta técnica para optimizar la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* ajustando los parámetros de tiempo de incubación, temperatura, solvente de extracción y proporción de disolventes. Con esto, determinaron que el tiempo de incubación óptimo es de 120 min, el tiempo de extracción de 60 min, y la relación de disolventes fue de 1:1, obteniendo 71.33% de ácidos grasos totales.

Kirrolia *et al.* [60] evaluaron la optimización del proceso y el efecto interactivo en una serie de variables empleando MSP, empleando variables como concentración de nitrato, fosfato, glucosa y pH, para optimizar la tasa de crecimiento celular, acumulación de lípidos y otros parámetros bioquímicos en *Chlorella sp.*, con lo cual se obtuvo un contenido de lípidos de 30.5 a 33.8% en peso seco con concentraciones limitadas de nitrato y fósforo, glucosa al 1% y pH 7.5.

Onumaegbu *et al.* [61] evaluaron el efecto de las microondas, el tiempo de exposición y el tiempo de extracción para aumentar el rendimiento lipídico de *Scenedesmus quadricauda* empleando MSR. Concluyeron que el rendimiento óptimo de lípidos fue del 49% a una potencia de 600 W, tiempo de calentamiento de 8 min y tiempo de extracción de 3.5 h.

Adam *et al.* [62] utilizaron MSR para determinar las condiciones óptimas de operación para la extracción de lípidos asistida con ultrasonido sin disolventes de *Nannochloropsis oculata*. Las condiciones óptimas para la extracción de aceite se estimaron de la siguiente manera: (i) potencia ultrasónica de 1000 W, (ii) tiempo de extracción de 30 min y (iii) contenido de peso seco de biomasa al 5%.

JUSTIFICACIÓN

Los cultivos de microalgas verdes se han perfilado como una solución atractiva para hacer frente a la crisis energética actual, ya que son capaces de producir aceites con un perfil adecuado para la producción de biocombustibles, además de presentar altas tasas de crecimiento sin el uso de tierras fértiles destinadas para la producción de alimentos. Los lípidos obtenidos de biomasa microalgal proporcionan una vasta gama de compuestos que pueden variar dependiendo de la composición del medio de cultivo. Está bien documentado que la adición de fuentes de carbono orgánico y el suministro adecuado de fósforo aumentan la producción de lípidos en cultivos de microalgas, sin embargo, la aplicación en conjunto de ambas estrategias debe seguir estudiándose para aumentar las probabilidades de éxito.

De acuerdo con lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia de la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono junto con el suministro adecuado de fósforo en el cultivo de cepas del género *Coelastrella* para la producción de lípidos.

HIPÓTESIS

La combinación de glucosa de melaza pretratada y fosfatos en una concentración adecuada en cultivos microalgales del género *Coelastrella* incrementará la concentración de biomasa y lípidos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la concentración óptima de melaza pretratada y fósforo para la producción de lípidos en cepas microalgales del género *Coelastrella* empleando la Metodología de Superficie de Respuesta.

Objetivos específicos

Realizar un pretratamiento fisicoquímico a la melaza y determinar la concentración de sacarosa y glucosa antes y después del pretratamiento.

Evaluar tres concentraciones de melaza pretratada y tres concentraciones de fósforo

Evaluar la producción de biomasa y lípidos producidos por las cepas.

Emplear la Metodología de Superficie de Respuesta para determinar la concentración de óptima de melaza pretratada y fósforo para la producción de lípidos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1.5 Material biológico

Las cepas microalgales CORE-1, CORE-2 y CORE-3 pertenecen al cepario de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (Figura 2.1). Las cepas se aislaron de cuerpos de agua dulce en la península de Yucatán, México. Se identificaron como pertenecientes al género *Coelastrella* de la familia Scenedesmaceae, mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido; y genéticamente a través de sus regiones ribosomales ITS-2 e ITS1-5.8S-ITS2 [39].

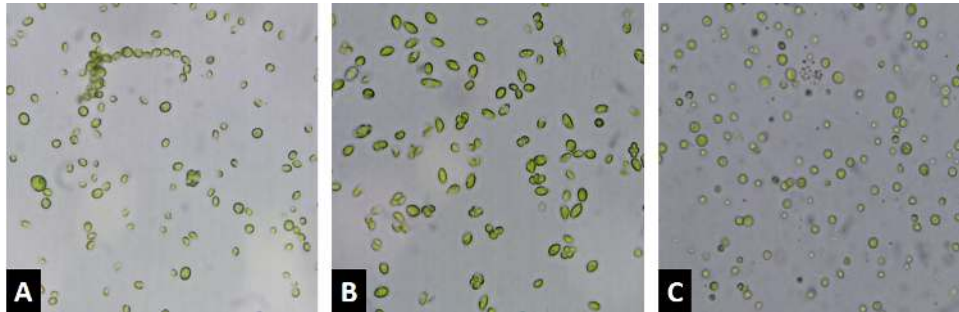


Figura 0.1 Microalgas usadas. A) CORE-1, B) CORE-2 y C) CORE-3.

1.6 Melaza

La melaza se colectó en el ingeniero azucarero “La Joya” ubicado en el municipio de Champotón, Campeche, México y donada por la Dra. Liliana Alzate Gaviria perteneciente a la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. La melaza fue mantenida en refrigeración a 4 °C hasta su uso [63]

1.6.1 Pretratamiento ácido de la melaza

Se preparó una solución de melaza al 10% (pv⁻¹), diluyendo 100 g de melaza en 900 mL de agua destilada. El pH fue ajustado a 1.0 con HCl 5 N y se calentó bajo condiciones de autoclave (120 °C, 15 psi, 20 min) para completar la hidrólisis de la sacarosa. Posteriormente la mezcla se dejó a temperatura ambiente y se centrifugó (Orto Alresa Digicen 21R) a 8,000 rpm por 15 para la separación de cenizas e impurezas. El pH fue ajustado a 7.0 con NaOH 2 M [31, 36].

Se empleó un tratamiento para la remoción de iones metálicos como lo describe Roukas [33]. Se agregaron 20 g de resina de intercambio catiónico (Diaion® PK228L) por cada 100 mL de la solución de melaza pretratada. La mezcla se homogenizó en una incubadora rotatoria (Labnet Orbit 1900) a 200 rpm durante 24 h a 26 ± 2 °C. Finalmente la resina se removió de la mezcla por filtración. La

resina usada fue donada por la Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Unidad Sureste.

El contenido de humedad se determinó por la técnica descrita por la A.O.A.C. 1980 y NMX-F428-1982, la proteína cruda se analizó por el método Kjeldahl [64], la fibra cruda se determinó con el equipo Fibertec y las cenizas totales fueron analizadas por peso seco.

1.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución

Se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés de *high performance liquid chromatography*) para determinar la concentración de glucosa antes y después del pretratamiento.

Se realizó una curva de calibración de fructosa, glucosa y sacarosa. Para ello se pesaron 10 mg de cada uno de los estándares de azúcares y se añadieron a un vial con 1 mL de mezcla de acetonitrilo: agua relación 1:1 para la concentración final de 10 mg mL⁻¹. Se tomaron 500 µL de esta solución y se añadió a otro vial con 500 µL de la mezcla de acetonitrilo: agua, para una concentración final de 5 mg mL⁻¹. Este procedimiento se repitió hasta obtener soluciones a 2.5 y 1.25 mg mL⁻¹. Se tomó 1 mL de la solución de melaza pretratada y 1 mL de la solución de melaza no pretratada y se diluyeron con agua destilada en relación 1:20. Tanto las muestras como la curva de calibración se filtraron a través de una membrana de celulosa de 0.45 µm para eliminar impurezas. Las muestras se analizaron por duplicado, mientras que la curva de calibración por triplicado. El volumen de inyección fue de 20 µL en un cromatógrafo HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity), se usó una columna para carbohidratos (Zorbax Carbohydrate Analysis Column 4.6×250 mm 5 micron) bajo un flujo de 2.0 mL min⁻¹ y 40°C de temperatura, teniendo como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: agua en relación 75:25. Se empleó un detector de índice de refracción (RID) a 35°C. El tiempo total de retención fue de 10 minutos a una presión de 86.7 bar.

1.7 Medios de cultivo

Se emplearon nueve medios de cultivo y un control para el crecimiento de las cepas CORE-1, CORE-2 y CORE-3 (Tabla 2.1).

Tabla 0.1 Medios de cultivos usados.

Nomenclatura	Descripción
Control-TAP	Medio Tris-Acetato-Fosfato
GBFB	2.5 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 0.5 mL L ⁻¹ fosfatos
GBFM	2.5 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 1.0 mL L ⁻¹ fosfatos
GBFA	2.5 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 1.5 mL L ⁻¹ fosfatos
GMFB	5.0 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 0.5 mL L ⁻¹ fosfatos
GMFM	5.0 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 1.0 mL L ⁻¹ fosfatos
GMFA	5.0 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 1.5 mL L ⁻¹ fosfatos
GAFB	7.5 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 0.5 mL L ⁻¹ fosfatos
GAFM	7.5 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 1.0 mL L ⁻¹ fosfatos
GAFA	7.5 g L ⁻¹ glucosa de melaza y 1.5 mL L ⁻¹ fosfatos

Se empleó un análisis de superficie de respuesta para determinar la producción de biomasa y lípidos, en función a las variables: concentración de glucosa de melaza (5.0 g L⁻¹, 7.5 g L⁻¹ y 10.0 g L⁻¹) y concentración de fosfato (0.5 mL L⁻¹, 1.0 mL L⁻¹ y 1.5 mL L⁻¹).

1.8 Purificación de las cepas

Las cepas fueron sometidas a un tratamiento con HCl 1 N y siembra en medio sólido para la eliminación de agentes biológicos no deseados que pueda inhibir su crecimiento, como lo describen López [65] y Falcón [66].

1.8.1 Choque ácido

Se partió de un cultivo de CORE-1, CORE-2 y CORE-3 de ocho días de crecimiento y se tomaron 10 mL de cada cultivo, se colocaron individualmente en tubos de 50 mL previamente esterilizados, y se centrifugaron a 5,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos (Orto Alresa Digicen 21R).

El sobrenadante se retiró por decantación en condiciones estériles (campana de flujo lamina ESCO Modelo LHG-4AG-F9) dejando en el fondo del tubo la pastilla de biomasa. Posteriormente se adicionaron 9 mL de medio de cultivo TAP y 1 mL de HCL 1N. La pastilla de biomasa se dispersó mediante agitación manual durante 1 min. Nuevamente se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces más con la finalidad con agua destilada estéril para eliminar el HCl remanente. Finalmente se tomó 5 mL y se añadió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo TAP y se incubó durante siete días con fotoperiodo 12:12 (luz/oscuridad) y una intensidad lumínica de $30 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 20 °C con agitación manual cada 24 horas para evitar daños mecánicos y estrés lumínico. Al día 7 se tomó una alícuota de cada cultivo y se observó en

microscopio óptico (Nikon Eclipse E200) con objetivo 40X para evaluar sus condiciones de axenidad y siembra en medio sólido.

1.8.2 Cultivo en medio de cultivo sólido

Después de la valoración de los cultivos tratados con HCl 1 N se procedió a cultivarlos en cajas Petri con medio de cultivo TAP sólido (Anexo A). Para ello se preparó y esterilizó medio de cultivo TAP con 7 g L⁻¹ de agar, y repartió en volúmenes de 15 mL en Cajas Petri de plástico. Una vez sólido se colocaron 100 µL de los cultivos tratados y se sembraron por agotamiento en estría. Los cultivos en caja Petri se incubaron por 20 días a 27 ± 2°C con un fotoperiodo de 16:8 (luz-oscuridad) y un flujo de fotones de 80 ± 5 µmol m⁻² s⁻¹.

1.8.3 Resuspensión en medio de cultivo líquido

Una vez formadas las colonias microalgales de cada una de las cepas se procedió a su resuspensión en medio de cultivo TAP líquido, mediante la toma de una colonia aislada, la cual se depositó en 30 mL de medio de cultivo TAP y en condiciones de incubación a 27 ± 2° con agitación manual cada 24 horas, con un fotoperiodo de 16:8 (luz/oscuridad) y un flujo de fotones de 80 ± 5 µmol m⁻² s⁻¹ por 15 días.

A partir de estos cultivos se realizaron nuevos precultivos de las cepas CORE-1, CORE-2 y CORE-3 en medio de cultivo TAP en matraces Erlenmeyer de 100 mL, en los cuales se realizaron los experimentos.

1.9 Cultivo microalgal

Los cultivos experimentales con medios de mencionados en la (Tabla 2.1) se iniciaron a partir de los precultivos anteriores. Se usaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL por triplicado, con 100 mL de volumen útil de medio de cultivo y una concentración celular inicial de 5×10⁵ células mL⁻¹. Las condiciones de cultivo fueron 27 ± 2°C a 130 rpm, con fotoperiodo 16:8 (luz-oscuridad) y un flujo de fotones de 80 ± 5 µmol m⁻² s⁻¹ proveída por lámparas led de luz blanca (Volteck Basic T8) durante 10 días hasta alcanzar la fase estacionaria.

1.9.1 Conteo celular

Se determinaron las curvas de crecimiento de cada cepa cultivada en los distintos medios de cultivo, tomando una alícuota, durante 10 días, de 500 µL de cultivo microalgal. La muestra se homogenizó en un vórtex y se colocaron 10 µL en un hematocitómetro Neubauer (Mariendfeld Neubauer-improved). Posteriormente se contaron las células mediante su observación en microscopio óptico (Nikon Eclipse E200) con objetivo 40 X. Cada cultivo se muestreó triplicado. El conteo se realizó considerando solamente a las células dentro de los cuadrantes marcados como se muestra en la Figura

2.2 y se realizó un promedio de los conteos en los cuadrantes. Se realizó una dilución 1:1 cuando la densidad celular era alta.

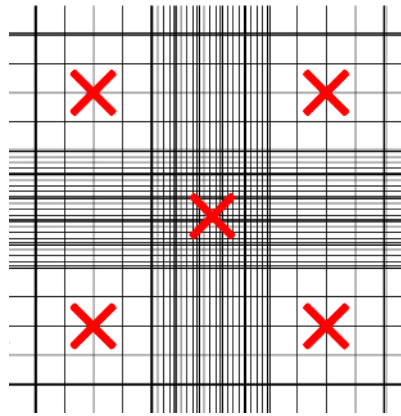


Figura 0.2 Hematocitómetro Neubauer.

La densidad celular se obtuvo con la ecuación (1) usada por Serrano [67]:

$$C = (X) (5 \times 10^4) (D) \quad (1)$$

Donde C es la concentración celular en cel mL^{-1} , X es el promedio de células contadas en los cinco cuadrantes y D es el factor de dilución.

1.10 Recuperación de la biomasa

La biomasa microalgal se dejó sedimentar por 24 horas y posteriormente se decantó, en esterilidad, 75 mL del medio de cultivo. El medio de cultivo restante se colocó en tubos de 50 mL y se centrifugó por 10 min a 5,000 rpm a 4 °C. La biomasa centrifugada se congeló a -8 °C durante 24 horas y se deshidrató por liofilización al vacío (Labconco, Modelo 7753020) a 0.1 bar, -53 °C por 72 horas. Finalmente, la biomasa se almacenó a -8 °C en oscuridad hasta su uso.

La productividad de biomasa se calculó mediante con la ecuación (2) obtenida de [68]:

$$P_B = \frac{\Delta X}{\Delta T} \quad (2)$$

Donde P_B es la productividad de biomasa en $\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, ΔX es la concentración de la biomasa seca en g L^{-1} y ΔT es el tiempo de incubación en días

1.11 Extracción de lípidos

Se empleó la técnica de lixiviación con solventes orgánicos. Para ello, la biomasa seca, previamente pesada, se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se maceró hasta reducir el tamaño de partícula con una espátula de acero inoxidable. Se agregaron 30 mL de una mezcla de cloroformo-metanol en

relación 2:1 para la extracción de lípidos polares y no polares y se colocó en una incubadora (Zhicheng ZHWY-200B) a 38 °C durante 3 horas a 150 rpm. Se separó el extracto de la biomasa por sedimentación colocando la mezcla en un embudo de separación de 125 mL. La extracción se realizó tres veces. Se recuperaron los extractos y se evaporaron los solventes a temperatura ambiente por 24 horas. El extracto lipídico puro se mezcló con cloroformo y se colocó en viales a peso constante.

El contenido de lípido (C_L) se calculó siguiendo la ecuación (3) empleado por Alam *et al.*, [59]

$$C_L = \frac{\text{Lípidos extraídos de biomasa seca}}{\text{Biomasa seca}} (100) \quad (3)$$

Donde C_L es el contenido lipídico en %, el peso de los lípidos de la biomasa seca y la biomasa se seca se denotan en $g L^{-1}$.

La productividad lipídica (P_L) se calculó de acuerdo a la ecuación (4) como establece Singh *et al.*, [15]:

$$P_L = (P_B)(C_L/100) \quad (4)$$

Donde P_L es la productividad lipídica en $g L^{-1} día^{-1}$, P_B es la productividad de la biomasa obtenida de la ecuación (2) y C_L es el contenido lipídico obtenido de la ecuación (3).

1.12 Cromatografía de capa delgada

Se utilizó cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés de *thin layer chromatography*) para la detección de los compuestos extraídos. Como fase estacionaria se usó una placa de gel de sílice (Cromatofolios Merck® 60) de 4 cm de ancho por 6 cm de alto y como fase móvil se usó una mezcla de hexano-acetato de etilo-ácido acético en una relación de 9:1:0.1 (v/v) la cual se colocó en un vaso de precipitado cerrado de 250 mL durante 30 minutos para alcanzar el equilibrio.

Se aplicaron aproximadamente 1 μL de cada una de las muestras previamente homogenizadas en la línea base de la placa de gel sílice a una distancia de 0.5 cm entre cada una y posteriormente se colocó en la fase móvil procurando que las muestras estén en contacto directo con la mezcla. Se dejó correr el solvente. La placa se dejó secar y se corrió nuevamente para obtener una mejor resolución.

Finalmente, las placas desarrolladas se revelaron por inmersión usando una solución de ácido fosfomolibdico al 10% en ácido sulfúrico y se secaron con aire caliente por 10 min. Se usó aceite vegetal como referencia para la detención de TAGs.

1.13 Análisis estadístico

La densidad celular (C), la productividad de biomasa (P_B) y la productividad de lípidos (P_L) de las cepas CORE-1, CORE-2 y CORE-3 cultivadas en los diferentes medios de cultivos fueron comparados mediante un análisis estadístico ANOVA usando la herramienta de análisis de datos de Excel y utilizando un nivel de confianza de 95% y $n=3$. Para la Metodología de Superficie de Respuesta se usó el programa Desing Expert Trial Version 12, este es un enfoque de diseño estadístico sistemático para analizar la relación entre variables para mejorar la respuesta. La forma general del modelo de segundo orden (Ecuación 6) se expresa como:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \dots \quad (6)$$

Donde Y es la respuesta, β_n es el coeficiente asociado a un factor n , y las letras A, B, C, representan las variables del modelo.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.14 Purificación de los cultivos

La experimentación partió de cultivos madre de las cepas CORE-1, CORE-2 y CORE-3 mantenidos durante un largo periodo de tiempo en medio de cultivo TAP a 20 °C sin agitación con fotoperiodo 12:12 (luz/oscuridad) y una intensidad lumínica de $30 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.1).



Figura 0.1 Cultivos madre. De derecha a izquierda: CORE-1, CORE-2 y CORE-3.

Los cultivos mostraron restos celulares, así como la presencia de contaminación por bacterias, las cuales pueden inhibir el crecimiento celular [24], por lo que se realizó la descontaminación de las tres cepas por medio del tratamiento con HCl 1 N y estriado en medio de cultivo sólido para obtener cultivos axénicos.

Los lavados con HCl y agua destilada estéril permiten que durante el proceso de centrifugación las microalgas, al ser células más pesadas, sedimenten; mientras que las bacterias queden suspendidas, promoviendo su separación. El cultivo en medio sólido permitió obtener colonias unialgales libres de microorganismos no deseados [69].

En la Figura 3.2 se muestran los cultivos en medio sólido de las tres cepas de microalgas, donde se aprecia que CORE-1 y CORE-2 forman colonias unialgales libres de bacterias. Sin embargo, CORE-3 muestra una elevada tasa de contaminación bacteriana, la cual inhibió su crecimiento.

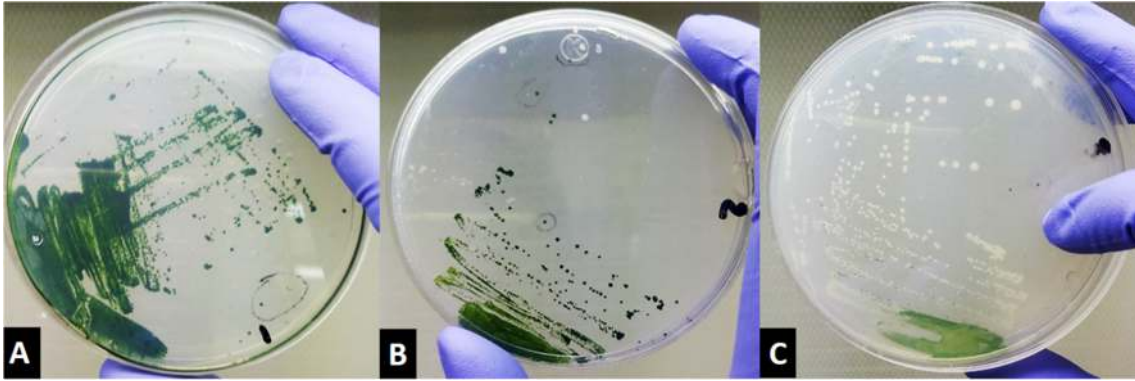


Figura 0.2 Cultivos en medio de cultivo sólido (TAP-Agar) posterior al tratamiento con HCl. A) CORE-1, B) CORE-2 y C) CORE-3.

CORE-3 fue sometida nuevamente al proceso de purificación con HCl 1 N y siembra en medio de cultivo sólido, donde finalmente se obtuvieron colonias unialgales libres de contaminación bacteriana, como se muestra en la Figura 3.3.



Figura 0.3 Obtención de colonias unialgales de CORE-3 posterior al segundo proceso de purificación.

A partir de estas colonias unialgales se obtuvieron los primeros precultivos de las tres cepas, los cuales fueron evaluados bajo microscopio óptico para asegurar sus condiciones axénicas (Figura 3.4).

La purificación de los cultivos resulta de gran importancia, debido a que la presencia de microorganismos no deseados puede inhibir el crecimiento de las microalgas, colapsando el cultivo [24].

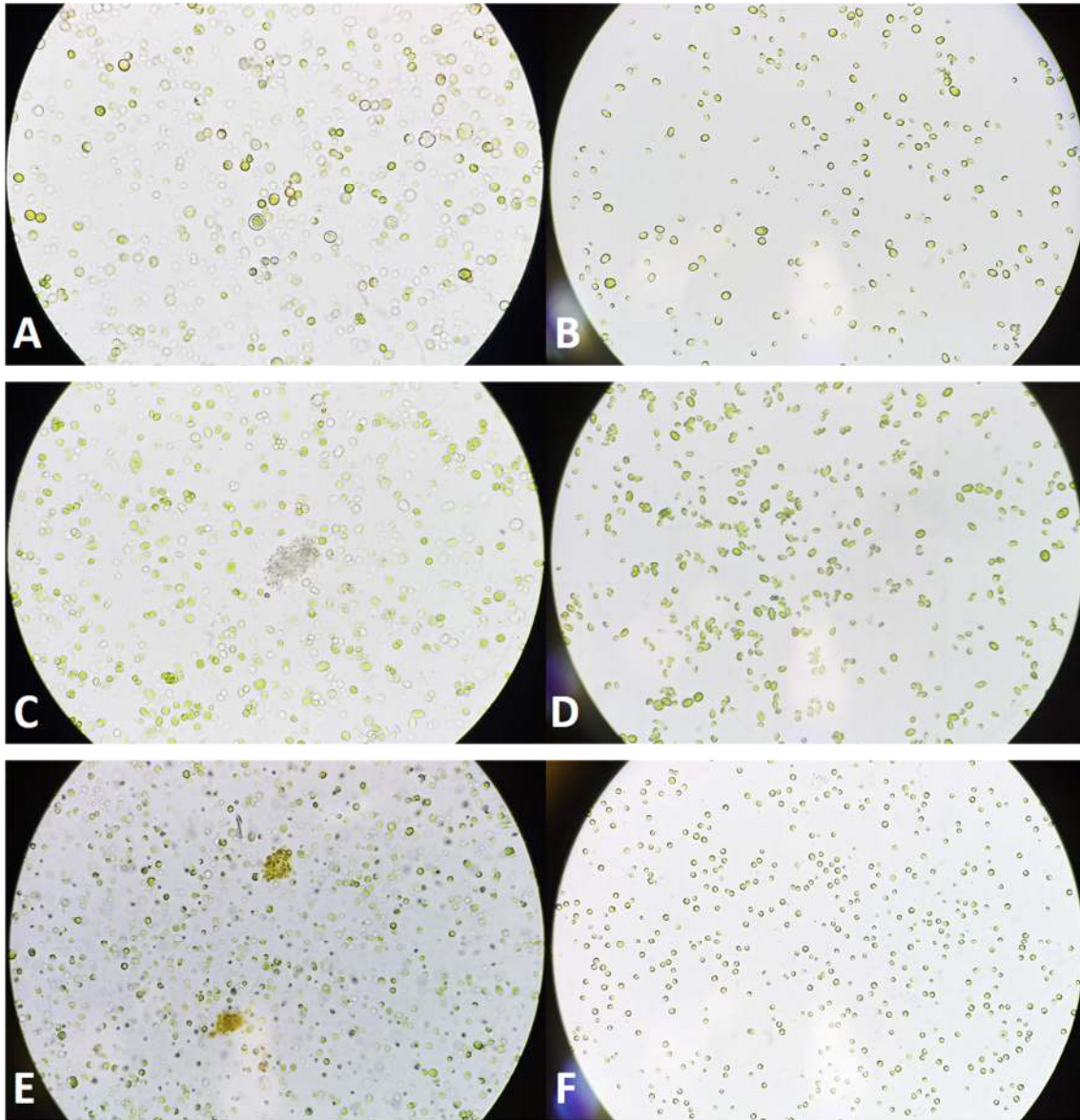


Figura 0.4 Cultivos microalgales tratados con HCl y estriado en medio sólido. CORE-1 antes (A) y después (B); CORE-2 antes (C) y después (D); CORE-3 antes (E) y después (F).

CORE-1 se sometió a resiembra a partir de las células en suspensión, debido a que continuaban precipitando. Se observó que realizando este procedimiento las células ya no se aglomeraban. Después de cinco resiembras bajo las condiciones de cultivo (Apartado 2.7) se logró obtener un cultivo libre de floculación celular (Figura 3.5).

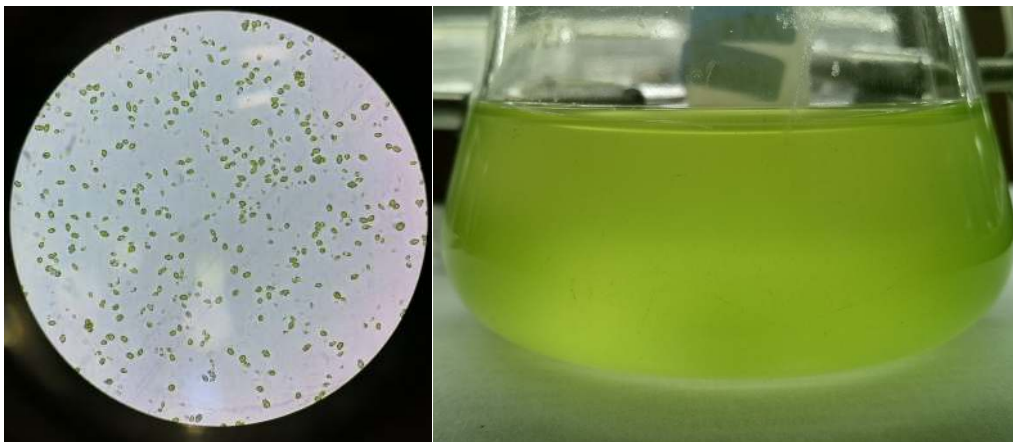


Figura 0.5 Cultivo celular de CORE-1, donde se aprecia la eliminación completa de los aglomerados celulares presentados anteriormente.

1.15 Pretratamiento de la melaza

Las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa obtenidas antes y después del pretratamiento de la melaza (con HCl 5 N, 120 °C, 15 psi, 20 min) son presentados en la Tabla 3.1. Así mismo, se muestran los tiempos de retención de los azúcares analizados por HPLC.

El tratamiento favoreció el incremento de glucosa y fructosa en 154.0 % y 20.3%, respectivamente. Mientras que la concentración de sacarosa disminuyó de $42.81 \pm 0.74 \text{ g L}^{-1}$ a $25.49 \pm 4.45 \text{ g L}^{-1}$. Esta respuesta se observa el cromatograma del HPLC (Figura 3.6), donde se muestra que la fructosa (pico 1) y la glucosa (pico 2) incrementaron después del pretratamiento, mientras que la sacarosa (pico 3) disminuyó.

Tabla 0.1 Identificación y cuantificación de los azúcares contenidos en las muestras de melaza, antes y después del pretratamiento.

Pico	T. de retención (min)	Compuesto	Concentración inicial (g L^{-1})	Concentración final (g L^{-1})
1	2.99	Fructosa	11.52 ± 0.32	14.53 ± 0.44
2	3.17	Glucosa	8.45 ± 0.32	28.52 ± 0.36
3	4.05	Sacarosa	42.81 ± 0.74	25.49 ± 0.03

Esto se debe a que la sacarosa esta compuesta por dos monómeros, β -D-fructosa y α -D-glucosa, unidos entre sí por enlaces glucosídicos, los cuales son rapidamente hidrolizados en condiciones fuertemente ácidas y temperaturas superiores a los 100 °C [70]. Quan *et al.*, [71] reportaron un aumento de más del 76% de azúcares reductores al agregar ácido sulfúrico concentrado a una solución de melaza, sin embargo, al disminuir el pH de la solución, la concentración de glucosa y fructosa no incrementó.

La concentración total de azúcares después del pretratamiento fue mayor (68.54 g L^{-1}) a la concentración antes del pretratamiento (62.79 g L^{-1}), este aumento puede deberse a la presencia de otros compuestos que fueron hidrolizados durante el pretratamiento y no tomados en cuenta en los estándares como D-manitol, ácido urónico y otros compuestos reductores [72].

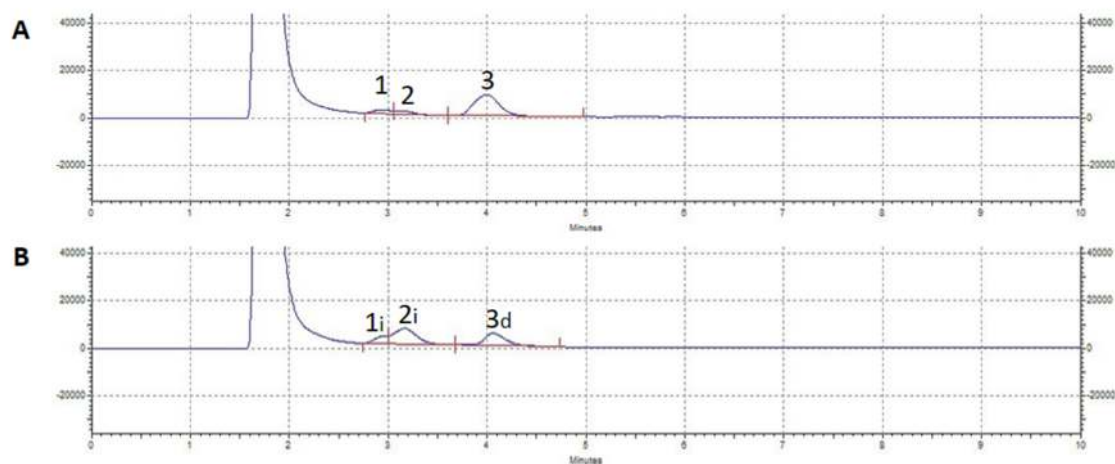


Figura 0.6 Cromatograma de HPLC de la melaza antes (A) y después (B) del pretratamiento. Las identidades de los picos del 1 al 3 fueron: fructosa, glucosa y sacarosa. Se analizaron $20 \mu\text{L}$ de cada muestra por duplicado. En el cromatograma, “i” denota incremento y “d” denota disminución.

Está bien documentado que es necesario realizar un pretratamiento a la melaza antes de agregarla a cultivos de microalgas para aumentar la concentración de azúcares simples (glucosa y fructosa) en el medio [34][36], por ejemplo, se ha reportado que aunque *Chlorella zofingiensis* creció satisfactoriamente en un cultivo con 50 g L^{-1} de sacarosa [73] y $10\% \text{ (v v}^{-1}\text{)}$ de lactosa [74], ambos casos tuvieron menores rendimientos de producción de biomasa, 5.46 y $\sim 2.2 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, en comparación a los cultivos adicionados con glucosa, 10.63 y 10.1 g L^{-1} , respectivamente.

Es importante mencionar que la melaza no solo contiene azúcares que pueden ser asimilados por las microalgas para su crecimiento (ver Tabla 1.8), sino también otros nutrientes y compuestos tales como proteínas, nitrógeno, cenizas, entre otros, los cuales deben ser analizados para conocer su composición, debido a que estos pueden variar [72]. En este trabajo se realizaron análisis proximales a la melaza antes y después del pretratamiento para conocer su efecto de éste sobre el contenido de proteínas, cenizas totales, grados Brix y porcentaje de humedad.

El contenido de proteína cruda fue analizado por el método Kjeldahl, cuyo contenido antes del pretratamiento era de $3.01 \pm 0.06 \%$, un valor similar al reportado por Drapcho *et al.* [35] de 3.0% en melaza de caña de azúcar. Posterior al pretratamiento el contenido de proteína cruda disminuyó a $0.02 \pm 0.03 \%$. Navarro *et al.* [75] mencionan que en procesos hidrolíticos ácidos, las proteínas se

degradan por el rompimiento de sus enlaces proteicos, convirtiéndose en aminoácidos como tirosina, fenilalanina, entre otros. De igual forma, su contenido de nitrógeno disminuyó de 0.48 ± 0.48 % a una concentración indetectable. Rearick [76] reporta que un tratamiento de exclusión iónico favorece la eliminación de compuestos nitrogenados en melaza de remolacha sin eliminar moléculas neutras más pequeñas como monosacáridos y disacáridos, por lo que en este trabajo la resina de intercambio catiónico empleada pudo participar en la disminución del contenido de nitrógeno después del pretratamiento.

Se determinó el contenido de cenizas totales mediante la carbonización en mufla a 550 °C. Antes del pretratamiento, el contenido de cenizas totales en la melaza era de 6.42 %, un valor más bajo que lo reportado por Drapcho *et al.* con un valor de 8.1 % para melaza de caña de azúcar y 8.7 % para melaza de remolacha [35]. Meyer & Wood [77] reportan que el contenido de ceniza en la melaza puede variar por la absorción excesiva de potasio del suelo durante el desarrollo de la planta, interfiriendo a la par con el contenido de azúcares simples. El contenido de ceniza totales disminuyó a 1.09 ± 0.025 % posterior al pretratamiento, representando una disminución del 83.33 %, esto debido a la precipitación de las cenizas y por efecto del ácido clorhídrico y su separación por centrifugación como lo reporta Beza en melaza de caña de azúcar [64].

El porcentaje de humedad fue medido usando la técnica descrita en la NMX-F428-1982, en este caso hubo un incremento en contenido de humedad posterior al pretratamiento, aumentando de 26.22 ± 0.10 % a 92.18 ± 0.03 %. Esto puede deberse a la dilución 9:1 realizada en pretratamiento Tabla 3.1, la concentración de sacarosa en la melaza antes y después del pretratamiento conforma menos como se indicó en el apartado 2.3.

Tabla 0.2 Contenido de la melaza antes y después del pretratamiento

Compuesto	Unidad	Antes	Después
Proteína cruda	%	30.01 ± 0.06	0.02 ± 0.03
Cenizas	%	6.42 ± 0.00	1.09 ± 0.025
Grados Brix	°Bx	1.46 ± 0.00	1.34 ± 0.00
Humedad	%	26.22 ± 0.10	92.18 ± 0.03

1.16 Crecimiento de *Coelastrella* sp. cepa CORE-1

CORE-1 presentó la formación de aglomerados celulares durante los pre-cultivos, lo que dificultaba el conteo celular para determinar su cinética de crecimiento. Por ello, esta cepa fue sometida a resiembras continuas tomando las células en suspensión hasta que finalmente se pudo obtener un cultivo libre de floculación celular (Figura 3.5). Sin embargo, esto retrasó sus cultivos en los medios experimentales con melaza y fosfatos, por lo que no se realizaron.

1.17 Crecimiento de *Coelastrella* sp. CORE-2 y CORE-3 en medio de cultivo TAP

En la Figura 3.7 se observan el crecimiento de las cepas CORE-2 y CORE-3 en medio de cultivo TAP, usado como referencia. CORE-2 muestra un periodo de adaptación de 24 horas, ya que a las 48 horas presentó el inicio de la fase exponencial que duró hasta el sexto día, seguida de la fase estacionaria hasta el día final del cultivo. La concentración celular alcanzada al final de la fase exponencial (9.93×10^7 cel mL⁻¹) por CORE-2 fue mayor a lo reportado por Cakmak *et al.*, [78] en un cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* en medio de cultivo TAP con 1.050×10^4 cel mL⁻¹. CORE-3 mostró una fase de adaptación de un día, seguida de la fase exponencial hasta el sexto día de cultivo, y finalmente la fase estacionaria que duró hasta el final del cultivo. La concentración celular final (1.88×10^7 cel mL⁻¹) fue mayor en CORE-3 comparado con CORE-2 en el mismo medio de cultivo.

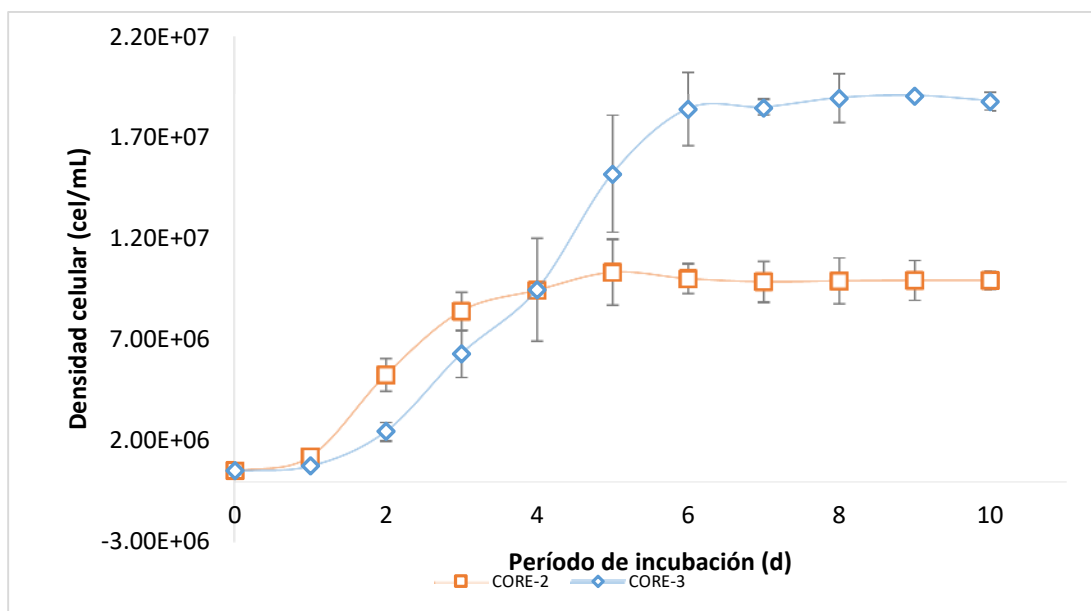


Figura 0.7 Cultivos control de CORE-2 y CORE-3 en medio TAP.

1.18 Crecimiento de *Coelastrella* sp. cepas CORE-2 y CORE-3 en presencia de melaza pretratada

El género *Coelastrella* es capaz de crecer en medios adicionados con glucosa, favoreciendo la producción de lípidos [9]. Por ello, el empleo de melaza de caña de azúcar pretratada puede emplearse como fuente de carbono para el cultivo de las cepas CORE-2 y CORE-3, debido a su contenido de glucosa. Así mismo, se ha reportado que un suministro adecuado de fósforo en el medio de cultivo induce al incremento de lípidos intracelulares [13]. En este estudio se evaluó el efecto combinado de tres concentraciones de glucosa de melaza pretratada (2.5, 5.0 y 7.5 g L⁻¹) y tres concentraciones de fósforo (0.5, 1.0 y 1.5 ml L⁻¹) en cultivos de CORE-2 y CORE-3 para obtener la mayor producción de lípidos en ambas cepas.

Para definir la concentración adecuada, se realizaron nueve medios de cultivos usando tres concentraciones de glucosa de melaza pretratada (2.5, 5.0 y 7.5 g L⁻¹) y tres concentraciones de buffer fosfatos (0.5, 1.0 y 1.5 ml L⁻¹). La concentración inicial de nutrientes en el medio de cultivo microalgal, influye en el crecimiento y la producción de metabolitos en *Coelastrella* sp. M-60 [9]. Esto debido a que en la etapa inicial del cultivo, un déficit de nutrientes provocaría la interrupción de la síntesis de biomoléculas, producción de energía, formación de pigmentos y soporte estructural [21, 25], mientras que una concentración alta conllevaría a una inhibición del crecimiento celular y la síntesis de clorofila interfiriendo en la actividad fotosintética. Así mismo provocaría la peroxidación de los lípidos, conduciendo a la interrupción de las funciones en la membrana [26, 27].

Los valores de crecimiento de la cepa CORE-2 cultivada en los diferentes medios de cultivos se muestran en las Tablas 3.3.

CORE-2 presentó la mayor densidad celular en el cultivo GMFM con 2.28×10^6 cel mL⁻¹, mientras que la menor densidad celular se registró en el cultivo GAFB con 2.56×10^5 cel mL⁻¹, a los 10 días de cultivo. Este resultado sugiere, que el crecimiento de CORE-2 fue inhibido por la alta concentración de glucosa debido a la saturación por sustrato como se mencionó anteriormente. Al compararse con el control, la densidad celular fue mucho menor en todos los casos. CORE-2 alcanzó una densidad celular de 9.93×10^6 cel mL⁻¹ cuando se usó acetato, aproximadamente nueve veces más células que el cultivo con más densidad celular cultivado con glucosa de la melaza pretratada. Andrade y Acosta [79] reportan que alteraciones en las condiciones de cultivo, como la fuente de carbono, puede resultar en un factor limitante desfavorable en el proceso metabólico, inhibiendo el crecimiento de las células. Por lo que, en este caso, un cambio drástico en la composición del medio de cultivo pudo provocar que la densidad celular disminuyera.

Tabla 0.3 Crecimiento de CORE-2 cultivadas en los diferentes medios de cultivos.

Medio	Conc. celular final (cel mL ⁻¹)
TAP (control)	$9.93 \times 10^6 \pm 4.42 \times 10^5$
GBFB	$1.54 \times 10^6 \pm 1.69 \times 10^5$
GBFM	$2.03 \times 10^6 \pm 3.18 \times 10^5$
GBFA	$1.83 \times 10^6 \pm 1.39 \times 10^5$
GMFB	$2.07 \times 10^6 \pm 2.11 \times 10^5$
GMFM	$2.28 \times 10^6 \pm 5.32 \times 10^5$
GMFA	$1.69 \times 10^6 \pm 2.06 \times 10^5$
GAFB	$2.56 \times 10^5 \pm 4.81 \times 10^4$
GAFM	$4.00 \times 10^5 \pm 7.26 \times 10^4$
GAFA	$4.17 \times 10^5 \pm 1.74 \times 10^4$

En la Figura 3.8 se muestran las curvas de crecimiento de CORE-2 en los medios experimentales.

Los cultivos GBFB, GBFM y GBFA que fueron suplementados con una concentración baja de glucosa (2.5 g L^{-1}) de la melaza pretratada mostraron una fase de adaptación de dos días y una fase exponencial no bien definida. En el caso del cultivo GBFB, a los 10 días de cultivo se aprecia una disminución en la densidad celular, lo que sugiere el inicio de la fase de muerte. Aunque el cultivo no se mantuvo en incubación más de 10 días para confirmarlo.

Los cultivos GMFB, GMFM y GMFA con una concentración media de glucosa de melaza pretratada (5.0 g L^{-1}) mostraron una fase de adaptación que duró seis días, cuatro días más que los cultivos en concentración baja. A medida que los cultivos entraron a la fase exponencial (significativa para la producción de metabolitos), las células mostraron una tasa de crecimiento rápido, lo que se reflejó en una densidad celular mayor, como se mostró en la Tabla 3.3.

Por su parte, los cultivos GAFB, GAFM y GAFA con concentración alta de glucosa (7.5 g L^{-1}) mostraron un comportamiento de inhibición celular, ya que a los 10 días había menos células que al inicio. Así mismo no se aprecia

La alta densidad celular el cultivo control-TAP puede deberse a que el acetato es asimilado más rápido por las microalgas, a diferencia de moléculas de mayor peso molecular como la glucosa y fructosa. Pérez *et al.* [80] reportaron que el acetato de sodio es una mejor fuente de carbono en comparación con la glucosa cuando es usado en cultivos de *Chlorella vulgaris* debido a su rápida metabolización.

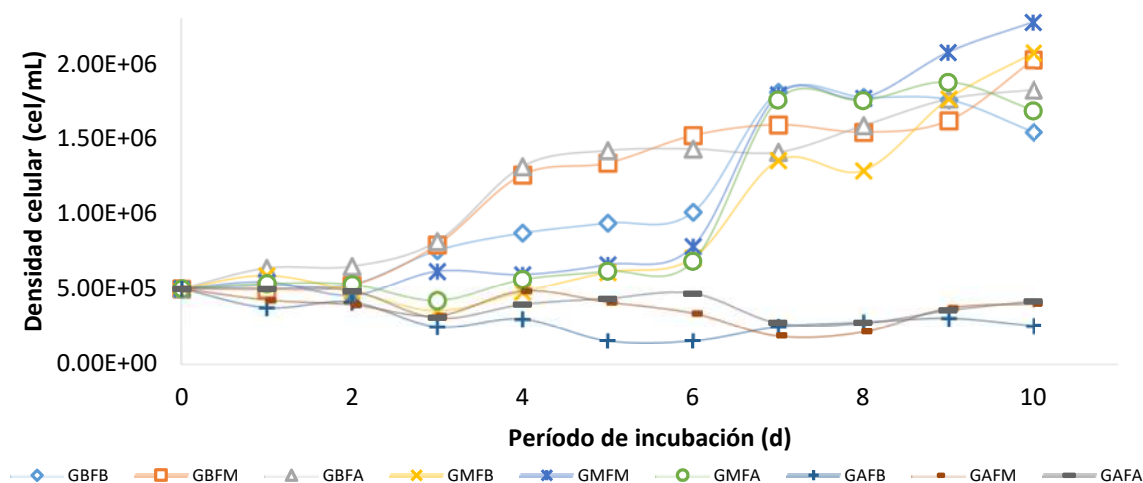


Figura 0.8 Curva de crecimiento de *Coelastrrella* sp. CORE-2 en medios con diferentes concentraciones de glucosa de melaza pretratada y buffer fosfatos con el control. Donde GB: concentración de glucosa baja (2.5 g L^{-1}), GM: concentración de glucosa media (5.0 g L^{-1}), GA: concentración de glucosa alta (7.5 g L^{-1}), FB: concentración de fosfatos bajo (0.5 mL L^{-1}), FM: concentración de fosfatos medio (1.0 mL L^{-1}), FA: concentración de fosfatos alto (1.5 mL L^{-1}).

Los valores de crecimiento de la cepa CORE-2 cultivada en los diferentes medios de cultivos se muestran en las Tablas 3.4.

CORE-3 mostró un comportamiento de inhibición celular en las concentraciones de glucosa baja y media debido a que la densidad celular fue menor comparada con el control. La densidad celular más alta en los medios suplementados con glucosa se obtuvo en el medio GBFA con 1.83×10^5 cel mL⁻¹, mientras que la más baja se obtuvo en el medio GMFA 1.17×10^5 cel mL⁻¹. Este resultado se puede atribuir a la inhibición por sustrato, como lo ocurrido en CORE-2. Por lo que se supuso que en una alta concentración de glucosa la densidad celular sería nula y el cultivo no se realizó. Kim *et al.* [81] reportó que la intensidad lumínica afectó el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* cultivada en condiciones mixotróficas, por lo que en este estudio es probable que la baja densidad celular de CORE-2 y CORE-3 esté relacionada con la cantidad de luz que es captada por la célula, ya que al añadirse melaza al cultivo, éste se torna en un color marrón oscuro.

Tabla 0.4 Crecimiento de CORE-3 cultivadas en los diferentes medios de cultivos.

Medio	Conc. celular final (cel mL ⁻¹)
TAP (control)	$1.88 \times 10^7 \pm 4.61 \times 10^5$
GBFB	$1.67 \times 10^5 \pm 8.66 \times 10^4$
GBFM	$1.67 \times 10^5 \pm 8.66 \times 10^4$
GBFA	$1.83 \times 10^5 \pm 4.41 \times 10^4$
GMFB	$1.39 \times 10^5 \pm 1.92 \times 10^4$
GMFM	$1.28 \times 10^5 \pm 1.11 \times 10^4$
GMFA	$1.17 \times 10^5 \pm 6.01 \times 10^4$

Los cultivos de CORE-3 en ambas concentraciones de glucosa presentaron un crecimiento discontinuo, donde no se definen las etapas de crecimiento celular como se muestra en la Figura 3.8. Este puede deberse a la incapacidad de la cepa a adaptarse a otra fuente de carbono como lo reportan Liu *et al.* [36]. Debido a esto, se decidió no continuar con los cultivos en una concentración de glucosa de 7.5 g L⁻¹. El inoculo inicial en todos los casos fue de 5.00×10^4 cel mL⁻¹, sin embargo, al décimo día de cultivo había un promedio de 1.50×10^5 cel mL⁻¹ en los cultivos suplementados con melaza pretratada, es decir, hubo menos células al final de los cultivos. Caso contrario al cultivo control donde se obtuvo una densidad celular de 1.88×10^7 cel mL⁻¹ en el día final.

Mondal *et al.*, [38] reportó una fase de adaptación de cinco días en un cultivo mixotrófico de *Chlorella sorokiniana*, debido a que cambios súbitos en parámetros de crecimiento, como luz o temperatura, provoca que la célula requiera más tiempo para aclimatarse a la nuevas condiciones de cultivo. En este estudio, un cambio en la fuente de carbono podrá ser la responsable de la baja densidad celular en los cultivos de CORE-3.

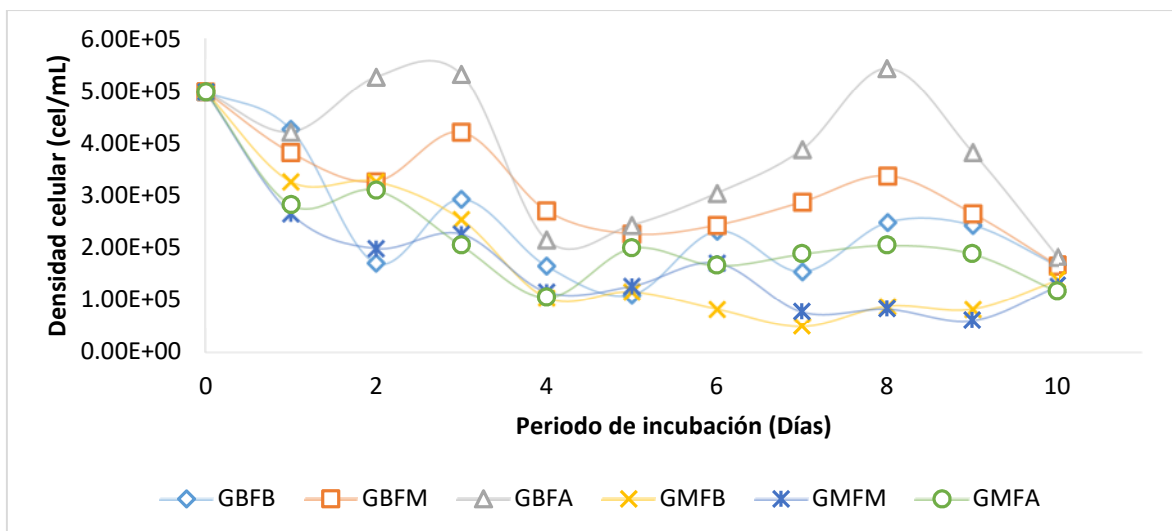


Figura 0.9 Curva de crecimiento de *Coelastrrella* sp. CORE-3 en medios con diferentes concentraciones de glucosa de melaza pretratada y buffer fosfatos con el control. Donde GB: concentración de glucosa baja (2.5 g L^{-1}), GM: concentración de glucosa media (5.0 g L^{-1}), FB: concentración de fosfatos bajo (0.5 mL L^{-1}), FM: concentración de fosfatos medio (1.0 mL L^{-1}), FA: concentración de fosfatos alto (1.5 mL L^{-1}).

1.19 Producción de biomasa

En la Tabla 3.5 se muestra la concentración y la productividad de la biomasa obtenidas por las cepas CORE-2 y CORE-3 cultivadas en el medio control y los medios suplementados con melaza pretratada.

Tabla 0.5 Concentraciones y productividades de biomasa por CORE-2 y CORE-3 después de 10 días de incubación con diferentes concentraciones de glucosa de melaza pretratada y fosfatos en volumen de 250 mL. Media de los datos \pm D.E. (n=3). N/A sin datos experimentales.

Medio de cultivo	CORE-2		CORE-3	
	Concentración de biomasa g L^{-1}	Productividad de biomasa $\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	Concentración de biomasa g L^{-1}	Productividad de biomasa $\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$
Control	0.62 ± 0.02	0.06 ± 0.002	0.47 ± 0.01	0.05 ± 0.001
GBFB	5.85 ± 3.43	0.58 ± 0.34	1.43 ± 0.10	0.14 ± 0.01
GBFM	4.63 ± 0.96	0.46 ± 0.09	1.55 ± 0.01	0.15 ± 0.001
GBFA	3.45 ± 0.19	0.35 ± 0.01	1.62 ± 0.05	0.16 ± 0.005
GMFB	3.47 ± 0.27	0.35 ± 0.02	1.74 ± 0.63	0.17 ± 0.06
GMFM	3.80 ± 0.73	0.38 ± 0.07	2.53 ± 1.62	0.25 ± 0.16
GMFA	5.36 ± 1.93	0.54 ± 0.19	1.05 ± 0.68	0.11 ± 0.06
GAFB	4.28 ± 0.46	0.43 ± 0.04	N/A	N/A
GAFM	3.71 ± 0.25	0.37 ± 0.02	N/A	N/A
GAFB	4.20 ± 0.33	0.42 ± 0.03	N/A	N/A

En los cultivos control, la productividad de biomasa en CORE-2 y CORE-3 fue de 0.06 y 0.04 g L⁻¹ día⁻¹, respectivamente. Valdez *et al.*, [82] reportó una concentración de biomasa de 0.70 g L⁻¹ en *Coelastrum* sp. a los 15 días de cultivo en medio TAP, siendo una concentración cercana a lo obtenido por CORE-2 en 10 días, pero superior a lo producido por CORE-3, por lo que aumentar el periodo de cultivo puede traducirse en un aumento en la producción de biomasa [10].

La mayor producción de biomasa en CORE-2 se obtuvo en el medio GBFB con 5.85 g L⁻¹, mientras que la menor fue en GBFA con 3.45 g L⁻¹, con productividades de 0.58 y 0.35 g L⁻¹ día⁻¹, respectivamente. CORE-3, por su parte, tuvo la mejor concentración de biomasa en el medio GMFM con 2.53 g L⁻¹ y una productividad de 0.25 g L⁻¹ día⁻¹; la menor concentración de biomasa se obtuvo en el medio GMFA, con 1.05 g L⁻¹ y una productividad de 0.11 g L⁻¹ día⁻¹. En todos los medios suplementados con melaza, la concentración y la productividad de biomasa fue mucho mayor al compararlas con los controles. Karpagam *et al.*, [9] y Wan *et al.*, [83] reportaron un incremento significativo en la concentración de biomasa en *Coelastrella* sp. y *Chlorella sorokiniana* cuando emplearon glucosa como fuente de carbono, debido a que la glucosa promueve la donación de electrones, promoviendo la transformación de energía en el sistema fotosintético, lo que se traduce en mayor energía para célula para la división celular [10]. La producción de biomasa por CORE-2 en los cultivos GBFB, GBFM, GMFM, GMFA, GAFB y GAFA es mayor a lo obtenido por Engin *et al.*, [31] en un cultivo de *Micractinium* sp. (3.73 g L⁻¹) usando 19 g L⁻¹ de melaza pretratada, sin embargo, CORE-3 tuvo una producción de biomasa menor en todos los medios de cultivo. Liu *et al.*, [36] reportaron una concentración de biomasa de 11.3 g L⁻¹ en un cultivo *Chlorella zofingiensis*, más del doble a lo obtenido por CORE-2 en el medio GBFB. El cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* de Gaurav *et al.*, [11] alcanzó una producción de 1.22 g L⁻¹, cercano a lo obtenido por CORE-3 en la mayoría de los medios suplementados con melaza.

Cabe destacar que en términos de concentración celular (Tablas 3.3 y 3.4), los cultivos control en ambas cepas obtuvieron mejores rendimientos a diferencia de los cultivos suplementados con melaza pretratada, sin embargo, esto no se refleja en la producción de biomasa. Singh *et al.*, [15] reportan que una disminución en el contenido de fósforo en el medio favorece la producción de biomasa, debido a la activación de rutas metabólicas alternas, sin embargo, también limita la división celular, ya que es un componente básico del ADN [16, 84].

En este estudio, se probaron tres concentraciones de fosfatos (0.5, 1.0 y 1.5 mL L⁻¹) para evaluar su efecto sobre la producción de biomasa y lípidos en las cepas *Coelastrella* sp. CORE-2 y CORE-3.

En los cultivos con concentración baja de glucosa (2.5 g L^{-1}), CORE-2 obtuvo la mayor producción de biomasa con 5.85 g L^{-1} cuando la concentración de fósforo era baja (0.5 mL L^{-1}). Al incrementar la concentración de este compuesto a 1.0 y 1.5 mL L^{-1} , la producción de biomasa disminuyó a 4.63 y 3.45 g L^{-1} , respectivamente. En la concentración media de glucosa (5.0 g L^{-1}), la respuesta fue opuesta, ya que al incrementar la concentración de fosfatos de 0.5 a 1.5 mL L^{-1} , la producción de biomasa incrementó de 3.47 g L^{-1} a 5.36 g L^{-1} . En la concentración alta de glucosa (7.5 g L^{-1}), la producción de biomasa no tuvo variación significativa, pues en la concentración baja y alta de fosfatos se obtuvieron producción de biomasa de 4.28 y 4.20 g L^{-1} , respectivamente.

CORE-3 por su parte, obtuvo rendimientos de biomasa cercanos en las tres concentraciones de fosfatos cuando la concentración de glucosa era baja, por lo que, en este caso, el aumento de fósforo en el medio no tuvo gran influencia en la producción de biomasa. Sin embargo, al duplicar la concentración de glucosa en el medio, la producción de biomasa aumentó considerablemente (2.53 g L^{-1}) cuando la concentración de fósforo se encontraba en 1.0 mL L^{-1} .

Estas respuestas heterogéneas, en cuanto a producción y productividad de biomasa en CORE-2 y CORE-3, pueden deberse a que la influencia combinada de la concentración de glucosa y fosfatos juntos, pues se ha reportado la combinación de concentraciones elevadas de carbono orgánico con la privación de nutrientes, como el fosforo, inducen a la producción de biomasa y lípidos en todas las especies microalgales analizadas [16, 30, 29].

Es necesario la optimización de las condiciones de cultivos (concentración de glucosa de melaza y fosforo) para mejorar la producción de biomasa en ambas cepas, ya que como se mencionó, no se encontró diferencias significativas. En la Tabla 3.6 se resumen los tres niveles y los rangos de los parámetros usados en el diseño, mientras que en la Tabla 3.7 se muestran las condiciones experimentales y la cantidad de biomasa obtenida usando un diseño Box-Behken.

Tabla 0.6 Variables de proceso con sus unidades y niveles utilizados en el Diseño Experimental.

Variable	Unidades	Niveles		
		-1	0	1
Concentración de glucosa	g L^{-1}	2.5	5.0	7.5
Concentración de fosfatos	mL L^{-1}	0.5	1.0	1.5

El uso del diseño Box-Behnken de la RSM tuvo como objetivo identificar los mejores niveles de las variables seleccionadas de concentración de glucosa ($2.5 - 7.5 \text{ g L}^{-1}$) y concentración de fosfatos ($0.5 - 1.5 \text{ mL L}^{-1}$) para obtener la mejor respuesta de g L^{-1} de biomasa (Tabla 3.7).

Tabla 0.7 Matriz de diseño experimental del diseño Box-Behnken que muestra los efectos de las variables del proceso en la respuesta de salida (g L⁻¹ de producción de biomasa). N/A sin datos experimentales.

Corrida	Entrada		Resultado	
	Variable 1 A: Concentración de glucosa g L ⁻¹	Variable 2 B: Concentración de fosfatos mL L ⁻¹	CORE-2 Respuesta Producción de biomasa g L ⁻¹	CORE-3 Respuesta Producción de biomasa g L ⁻¹
1	2.5	0.5	5.85 ± 3.43	1.43 ± 0.10
2	2.5	1	4.63 ± 0.96	1.55 ± 0.01
3	2.5	1.5	3.45 ± 0.19	1.62 ± 0.05
4	5	0.5	3.47 ± 0.27	1.74 ± 0.63
5	5	1	3.80 ± 0.73	2.53 ± 1.62
6	5	1.5	5.36 ± 1.93	1.05 ± 0.68
7	7.5	0.5	4.28 ± 0.46	N/A
8	7.5	1	3.71 ± 0.25	N/A
9	7.5	1.5	4.20 ± 0.33	N/A

Se empleó la ecuación polinomial de segundo orden (6) para determinar la relación entre las variables y las respuestas. Se calcularon los coeficientes de la ecuación y los datos se ajustaron a la ecuación (6) empleando Desing Expert Trial Version 12.

La respuesta final para producción de biomasa de CORE-2 y CORE-3, en termino de factores codificados, se presentan en las ecuaciones (7) y (8), respectivamente.

$$\text{Biomasa} = 4.47 + 0.0442A - 0.2261B + 0.0650AB - 0.4309A^2 + 0.0991B^2 \quad (7)$$

$$\text{Biomasa} = 1.11 + 0.5796A + 0.2167B - 0.3395AB + 0.6861A^2 - 0.6939B^2 \quad (8)$$

Donde el primer término de la ecuación es el coeficiente asociado a un factor n, A representa la influencia de la concentración de la glucosa y B representa la influencia de la concentración de fósforo.

En las Figuras 3.9a y b se muestran los gráficos tridimensionales de la producción de biomasa por CORE-2 y CORE-3 relacionada a las variables de concentración de glucosa y concentración de fosfatos. En la cepa CORE-2 se observa que la concentración de glucosa tiene una influencia mayor en la producción de biomasa a diferencia de la concentración de fosfatos. La mejor producción de biomasa se obtiene cuando la glucosa está en una concentración entre 2.5 – 5.0 g L⁻¹, pues en este rango CORE-2 alcanzó una producción de biomasa promedio de 4.42 g L⁻¹, mientras que el control

obtuvo 0.62 g L^{-1} . Así mismo, CORE-3 mostró el mejor rendimiento de biomasa cuando la concentración de glucosa se mantenía entre $4.5 - 5.0 \text{ g L}^{-1}$. Esto concuerda con lo reportado por Kirrolia *et al.*, [60] donde mencionan que la glucosa tuvo una influencia más significativa en la producción de biomasa que los fosfatos en un cultivo de *Chlorella* spp. De igual forma, la glucosa proveniente de un efluente de la industria de la caña de azúcar aumentó la concentración de biomasa en un cultivo de *Coelastrella* sp. según Karpagam *et al.*, [9], donde su análisis de RSM demostró que esta variable tiene un efecto positivo en el crecimiento de la microalgas, así como en la acumulación de lípidos.

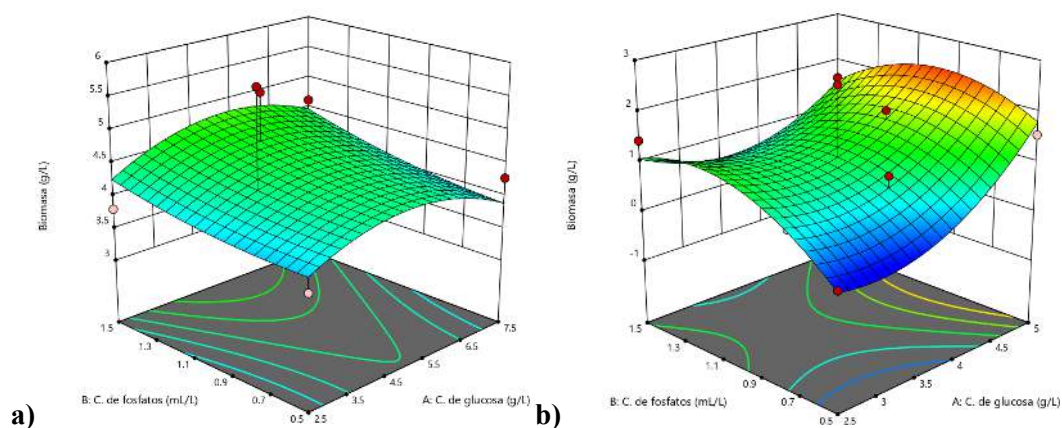


Figura 0.10 Gráfico de superficie en 3D para la respuesta de producción de biomasa, a) CORE-2 y b) CORE-3.

Los datos experimentales obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor (ANOVA), donde no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$, $n=3$). Cabe destacar que la producción de biomasa aumentó en más del 50% cuando se empleó melaza pretratada al cultivo comparado con el control, por lo que emplear este residuo agrícola como fuente de carbono puede propiciar a cultivos microalgales más rentables y con mejores rendimientos.

1.20 Producción de lípidos

Posterior a la obtención de la biomasa se prosiguió con la extracción de lípidos con una mezcla de solventes polar/no polar para asegurar la extracción total de lípidos [85, 86]. En la Tabla 3.9 se muestra la concentración (g L^{-1}), el contenido ($\% \text{ p p}^{-1}$) y la productividad de los lípidos ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de las cepas CORE-2 y CORE-3 en los medios experimentales.

Tabla 0.8 Concentración, contenido y productividad de lípidos obtenidos por CORE-2 y CORE-3 en los diferentes medios suplementados con melaza. N/A: sin datos experimentales.

Medio de cultivo	CORE-2			CORE-3		
	Concentración de lípidos (g L ⁻¹)	Contenido de lípidos (% p p ⁻¹)	Productividad lipídica (g L ⁻¹ día ⁻¹)	Concentración de lípidos (g L ⁻¹)	Contenido de lípidos (% p p ⁻¹)	Productividad lipídica (g L ⁻¹ día ⁻¹)
Control	0.10	16.12	0.01	0.04	10.00	0.005
GBFB	0.41	7.00	0.04	0.17	12.23	0.017
GBFM	0.64	13.82	0.06	0.13	8.83	0.013
GBFA	0.45	13.04	0.04	0.15	9.25	0.015
GMFB	0.39	11.23	0.03	0.06	3.79	0.006
GMFM	0.59	15.52	0.05	0.24	9.64	0.024
GMFA	0.56	10.44	0.05	0.07	7.04	0.008
GAFB	0.10	2.33	0.01	N/A	N/A	N/A
GAFM	0.65	17.52	0.06	N/A	N/A	N/A
GAFA	0.30	7.14	0.03	N/A	N/A	N/A

CORE-2 tuvo la mayor concentración de lípidos (0.65 g L⁻¹) en el medio GAFM, representando el 17.52 % del peso total de la biomasa seca y una productividad de 0.06 g L⁻¹ día⁻¹. La productividad lipídica es el resultado combinado de la productividad de la biomasa como del contenido de lípidos. En el medio GBFM se obtuvo una concentración de lípidos similar (0.64 g L⁻¹), sin embargo, el contenido de lípidos (13.82 %) fue menor. La concentración, el contenido y la productividad de lípidos más bajo se obtuvo en el medio GAFB con 0.10 g L⁻¹, 2.33 % y 0.01 g L⁻¹ día⁻¹, respectivamente. CORE-3 por otra parte alcanzó la mayor producción de lípidos (0.24 g L⁻¹) en el medio GMFM, con un contenido de 9.64 % y productividad de 0.024 g L⁻¹. Sin embargo, el mayor contenido lipídico se obtuvo en el medio GBFB con 12.23 %. La menor producción (0.06 g L⁻¹) en el medio GMFB con un contenido de 3.79 % y 0.006 g L⁻¹ día⁻¹ de productividad. En los cultivos control, CORE-2 acumuló una concentración de lípidos de 0.10 g L⁻¹, lo que representó el 16.12 % con una productividad de 0.01 g L⁻¹ día⁻¹. Mientras que CORE-3 mostró una concentración, un contenido y una productividad de lípidos menor que CORE-2 de 0.04 g L⁻¹, 10.0 % y 0.005 g L⁻¹ día⁻¹, respectivamente.

La concentración de lípidos en CORE-2 y CORE-3 aumentó en presencia de melaza pretratada, se ha reportado que la glucosa sirve como donante de carbono orgánico para el crecimiento fotoheterotrófico en microalgas [87]. Así mismo, el suministro adecuado de fósforo en el medio de cultivo favorece el aumento de biomasa y lípidos, debido a la activación de rutas metabólicas alternas [15]. El crecimiento mixotrófico de microalgas bajo estrés nutricional y la suplementación con la fuente orgánica se puede explorar más a fondo para mejorar el almacenamiento de lípidos [9].

En la Figura 3.10 se muestra gráficamente la producción de lípidos de CORE-2 y CORE-3.

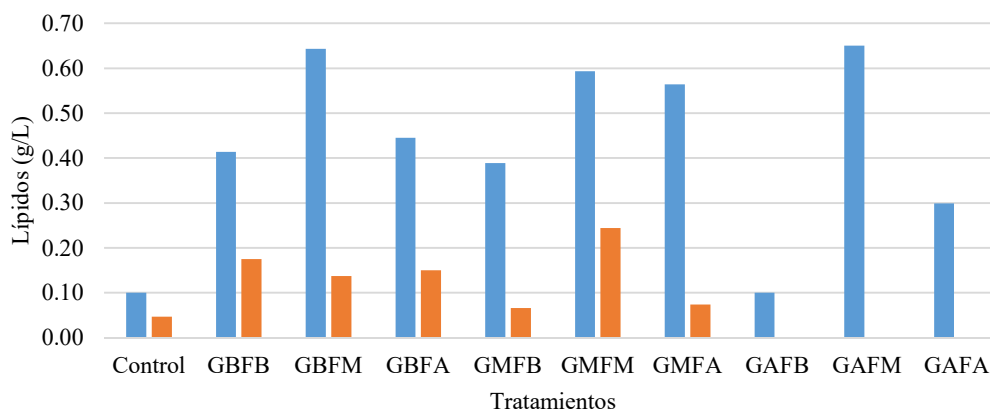


Figura 0.11 Producción de lípidos por CORE-2 (barra azul) y CORE-3 (barra naranja) en los diferentes medios de cultivo. Donde GB: concentración de glucosa baja (2.5 g L^{-1}), GM: concentración de glucosa media (5.0 g L^{-1}), GA: concentración de glucosa alta (7.5 g L^{-1}), FB: concentración de fosfatos bajo (0.5 mL L^{-1}), FM: concentración de fosfatos medio (1.0 mL L^{-1}), FA: concentración de fosfatos alto (1.5 mL L^{-1}). El eje Y es la concentración de lípidos en g L^{-1} y el eje X son los medios de cultivos usados.

CORE-2 (barra azul) presentó mayor concentración de lípidos que CORE-3 (barra naranja) en todos los medios de cultivos probados y una producción 9.4 veces más alta en comparación al cultivo control. Así mismo, los cultivos con concentración media de fosfatos (GBFM, GMFM y GAFM) mostraron concentraciones más altas de lípidos entre grupos. Esto puede deberse a que este elemento, en una dosis adecuada, estimula la asimilación del sustrato por la microalga. Esto ha sido reportado por Shen *et al.*, [13] en un cultivo de *Scenedesmus obliquus*. Karpagam *et al.* [9] y Singh *et al.* [15] reportaron que la privación de fósforo no mostró aumento significativo en el contenido de lípidos en cultivos de *Coelastrella sp.* y *Ankistrodesmus falcatus*. Sonkar *et al.* [16] estudiaron el efecto de cuatro estrategias de limitación de fósforo en cinco microalgas verdes, en su trabajo concluyen que la mejor forma de aumentar la producción de lípidos es agregar dosis pequeñas de fósforo cada 72 horas, debido a que de esta forma la división celular no se verá interrumpida, lo que resultará en la producción de más biomasa y lípidos.

Por otra parte, la concentración de melaza pretratada en el medio de cultivo, mostró tener una influencia más significativa en la producción de lípidos, ya que al compararse con los controles es evidente la alta producción. Se ha reportado que las fuentes de carbono orgánico (como la glucosa) aumentan la producción de lípidos en las microalgas [88], sin embargo, el empleo de glucosa pura aumenta los costos de producción en más del 50% [34]. Así pues, el uso de melaza en cultivos microalgales se ha perfilado como una alternativa económica para usarse como fuente de carbono, debido a su alto contenido en azúcares simples [31], bajo costo [82] y alto contenido de otros

nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas como *Chlorella pyrenoidosa* [11], *Chlorella zofingiensis* [36], *Micractinium* sp. [31], *Chlorella* sp. [12] y *Coelastrum* sp. [82]

Al igual que en la producción de biomasa, se empleó MSR para encontrar la mejor producción de lípidos en relación con la concentración de glucosa de la melaza pretratada y la concentración de fosfatos (Figura 3.11).

Se empleó la ecuación polinomial de segundo orden (6) para determinar la relación entre las variables y las respuestas. Se calcularon los coeficientes de la ecuación y los datos se ajustaron a la ecuación (6) empleando Desing Expert Trial Version 12.

La respuesta final para producción de lípidos de CORE-2 y CORE-3, en termino de factores codificados, se presentan en las ecuaciones (9) y (10), respectivamente.

$$\text{Lípidos} = 1.29097 - 0.224176A - 0.694656B + 0.120AB + 0.006111A^2 + 0.184772B^2 \quad (9)$$

$$\text{Lípidos} = 0.0784 + 0.0322A + 0.0336B - 0.04055AB + 0.0076A^2 + 0.0236B^2 \quad (8)$$

Donde el primer término de la ecuación es el coeficiente asociado a un factor n, A representa la influencia de la concentración de la glucosa y B representa la influencia de la concentración de fósforo.

Como se mencionó anteriormente, la concentración de glucosa mostró una influencia más significativa que la concentración de fosfatos. CORE-2 mostró una mejor adaptación a los cultivos suplementados con melaza que CORE-3. Este resultado se reflejó en una mayor densidad celular (Tablas 3.3 y 3.4), una mayor producción y productividad de biomasa (Tabla 3.5) y una producción de lípidos más alta (Tabla 3.9 y Figura 3.10). Como se muestra en la Figura 3.11a, CORE-2 mostró una alta acumulación de lípidos con una concentración de glucosa entre 2.5 y 5.0 g L⁻¹, con una producción promedio de lípidos de 4.42 g L⁻¹. CORE-3 mostró el mismo comportamiento (Figura 3.11b), debido a que, al aumentar la concentración de glucosa en el medio de 2.5 g L⁻¹ a 5.0 g L⁻¹, la producción de lípidos aumentó 20%.

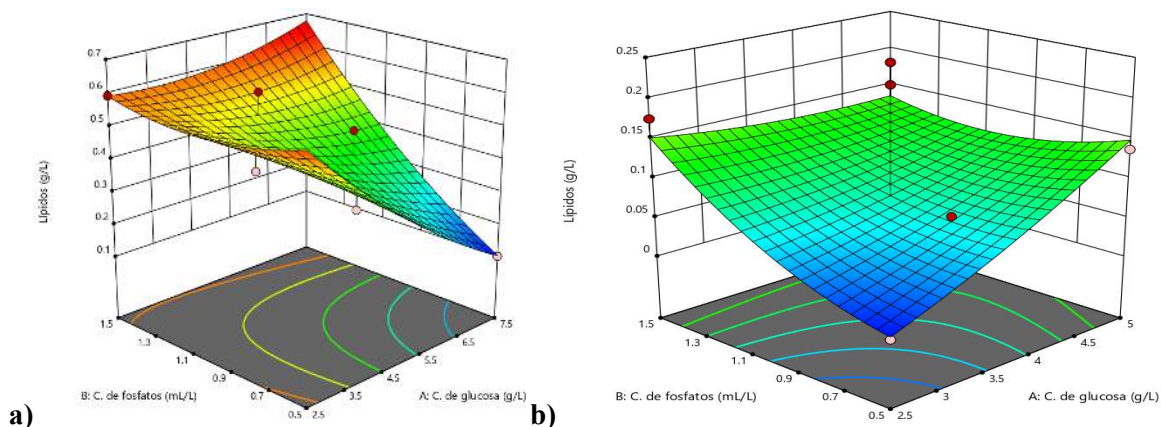


Figura 0.12 Gráfico de superficie en 3D para la respuesta de producción de lípidos, a) CORE-2 y b) CORE-3.

Una respuesta similar a la obtenida es la reportada por Karpagam *et al.* [9] al suplementar el medio de cultivo con efluentes de la industria de la caña de azúcar, con lo cual el cultivo de *Coelastrella sp.* presentó un aumento significativo en la producción de lípidos, a diferencia del estrés provocado por la limitación de fósforo. Mondal *et al.* [38] reportan que *Chlorella sorokiniana* presentó contenidos de lípidos de 30.6 % cuando se cultivó en 5 g L⁻¹ de melaza, aproximadamente el doble de lo obtenido por CORE-2 en el medio GAFM. Manzoor *et al.* [68] lograron una productividad de 0.056 g L⁻¹ día⁻¹ y un contenido de lípidos de 13.55 % en un cultivo de *Chlorella sp.* con hidrolizado de melaza de caña de azúcar. Estos resultados son similares a los obtenidos por CORE-2. Karpagam *et al.* [10] reportaron que la limitación de fósforo no mostró diferencias significativas en la acumulación de lípidos en *Chlamydomonas reinhardtii*, sin embargo, al adicionar glucosa al cultivo, la productividad aumentó considerablemente.

1.21 Cromatografía de capa delgada del extracto final

Los extractos lipídicos con una concentración de 1% aproximadamente, fueron analizados. En las Figuras 3.12, 3.13 y 3.14 se muestran los perfiles lipídicos obtenidos en los cultivos control, CORE-2 y CORE-3 cultivadas en los distintos medios de cultivos.

En los cultivos control se aprecian los compuestos lipídicos. En la parte superior de la placa (cuadro amarillo) (Fig 3.11), se muestran los compuestos pertenecientes a los alcanos, compuestos de un enlace con baja polaridad [66]. Hu *et al.* [44] identificaron este grupo como ésteres de colesteroilo en un cultivo de *Coelastrella sp.*, los cuales pueden ser hidrolizados por medio de actividad enzimática derivando en ácidos grasos libres. En la parte inferior (cuadro azul) se muestran los grupos correspondientes a los terpenos, ácidos grasos y esteroides, estos últimos son compuestos estructurales sintetizados durante la división celular [53, 82]. En la zona de aplicación (cuadro rosa) se encuentran los compuestos más polares del extracto, correspondiente a los fosfolípidos [44], los cuales son

componentes de la membrana celular que se unen a los orgánulos y les dan soporte [5, 89]. En la zona media (cuadro rojo) se muestran los compuestos no polares, conformados principalmente por triacilglicéridos (TAG) [44, 53].

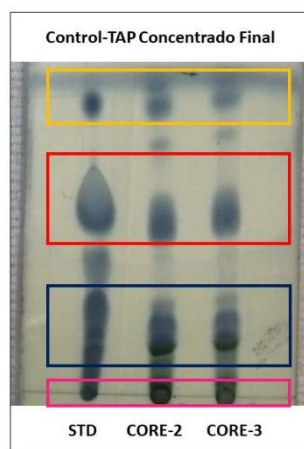


Figura 0.13 Cromatografía de capa delgada de los cultivos control de CORE-2 y CORE-3. STD: aceite vegetal.

CORE-2 mostró las mismas secciones de grupos de lípidos que el control (Figura 3.12). Sin embargo, es evidente una baja concentración de TAGs, ya que las manchas correspondientes a ese grupo son tenues, y en algunos casos (GAFB) son imperceptibles. Esto podría indicar que la alta concentración de lípidos obtenidos está conformadas principalmente por terpenos y esteroides, ya que las manchas en esas secciones son más prominentes.

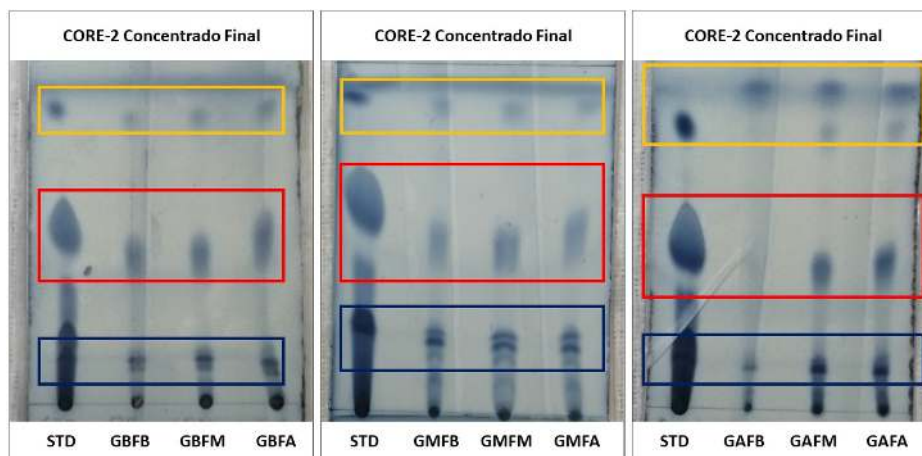


Figura 0.14 Cromatografía de capa fina de CORE-2 en los diferentes medios de cultivo.

Como se mostró en la Tabla 3.9, CORE-3 presentó una menor producción de lípidos en comparación con CORE-2, lo que se ve reflejado en una baja concentración de compuestos lipídicos en la placa de TLC (Figura 3.13). En los cultivos con una concentración baja de glucosa, la concentración de TAG

es muy baja. En los medios GMFM y GMFA, se percibe la presencia de TAG, sin embargo, su concentración es inferior al estándar.

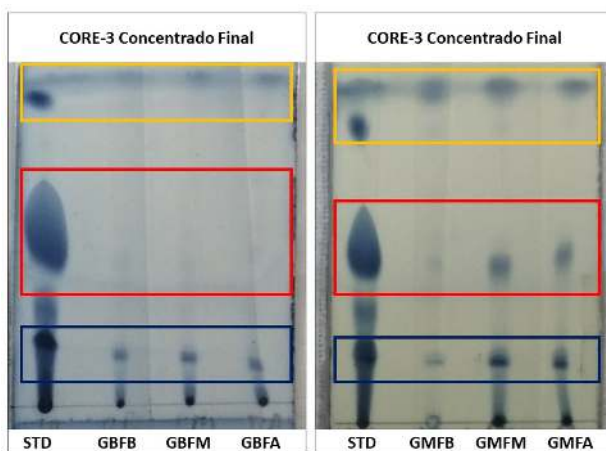


Figura 0.15 Cromatografía de capa fina de CORE-3 en los diferentes medios de cultivo.

La baja concentración de TAG en el medio podría deberse a que el periodo de incubación fue insuficiente para que su síntesis. Valdez *et al.* [82] reportaron un aumento significativo en el contenido de TAG en *Coelastrum* sp. a los 15 días de cultivo. Así mismo, Karpagam *et al.* [10] reporta que el tiempo de cultivo es una de las variables más importantes para el aumento de lípidos en cultivos microalgales.

CONCLUSIONES

El pretratamiento químico de la melaza incremento su contenido de glucosa 3.37, lo que la convierte en una fuente de carbono atractiva para las cepas *Coelstrella* sp. CORE-2 y CORE-3.

CORE-2 y CORE-3 produjeron más lípidos en todos los cultivos experimentales probados a comparación del control en medio TAP.

Las mejores condiciones de cultivo que favorecieron el incremento de la producción de lípidos en CORE-2 fueron 7.5 g L^{-1} de glucosa de melaza y 1.0 mL L^{-1} de fosfatos, mientras que en CORE-3 fueron 5.0 gr L^{-1} de glucosa de melaza y 1.0 mL L^{-1} de fosfatos.

El análisis de superficie de respuesta mostró que la variable determinante para el aumento de lípidos en los cultivos fue la concentración de glucosa, ya que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de fosfatos.

Las placas de TLC muestran que CORE-2 produjo más triacilglicéridos que CORE-3.

CORE-2 mostró mejor potencial para la producción de lípidos en comparación con CORE-3, en cultivos adicionados con melaza.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Suriya Narayanan, G., Kumar, G., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S., Premalatha, M., (2018) Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp . FI69 in bubble column reactor for the application of biofuel production, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 14, pp 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.022>.
- [2] Leong, W. H., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., Ho, Y. C., (2018) Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 91(April 2017), pp 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.066>.
- [3] Rittmann, B. E., (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms, *Biotechnol. Bioeng.*, 100(2), pp 203–212. <https://doi.org/10.1002/bit.21875>.
- [4] Fernández, L., Montiel, J., Millán, A., Badillo, J., (2012) Producción de biocombustibles a partir de microalgas, *Ra Ximhai - Rev. Soc. Cult. Desarro.*, 8(3), pp 543–558. <https://doi.org/ISSN:1665-0441>.
- [5] Sajjadi, B., Chen, W., Aziz, A., Raman, A., Ibrahim, S., (2018) Microalgae lipid and biomass for biofuel production : A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 97(November 2017), pp 200–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>.
- [6] Gangadhar, K. N., Pereira, H., Diogo, H. P., Borges dos Santos, R. M., Prabhavathi Devi, B. L. A., Prasad, R. B. N., Custódio, L., Malcata, F. X., Varela, J., Barreira, L., (2016) Assessment and comparison of the properties of biodiesel synthesized from three different types of wet microalgal biomass, *J. Appl. Phycol.*, 28(3), pp 1571–1578. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0683-5>.
- [7] Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., Renganathan, S., (2016) Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 55, pp 909–941. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.026>.
- [8] Dimitrova, P., Marinova, G., Alexandrov, S., Iliev, I., Pilarski, P., (2017) Biochemical Characteristics of a Newly Isolated Strain *Coelastrella* Sp . Bgv Cultivated At Different Temperatures and Light Intensities, 102, pp 139–146.
- [9] Karpagam, R., Raj, K. J., Ashokkumar, B., Varalakshmi, P., (2015) Characterization and fatty

acid profiling in two fresh water microalgae for biodiesel production: Lipid enhancement methods and media optimization using response surface methodology, *Bioresour. Technol.*, 188, pp 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.053>.

- [10] Karpagam, R., Preeti, R., Ashokkumar, B., Varalakshmi, P., (2015) Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 121, pp 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.015>.
- [11] Gaurav, K., Srivastava, R., Sharma, J. G., Singh, R., Singh, V., (2016) Molasses-based growth and lipid production by *Chlorella pyrenoidosa*: A potential feedstock for biodiesel, *Int. J. Green Energy*, 13(3), pp 320–327. <https://doi.org/10.1080/15435075.2014.966268>.
- [12] Zheng, H., Ma, X., Gao, Z., Wan, Y., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Liu, Y., Huang, H., Chen, P., Ruan, R., (2015) Lipid production of heterotrophic *Chlorella* sp. from hydrolysate mixtures of lipid-extracted microalgal biomass residues and molasses, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 177(3), pp 662–674. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1770-4>.
- [13] Shen, X. F., Liu, J. J., Chu, F. F., Lam, P. K. S., Zeng, R. J., (2015) Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation, *Appl. Energy*, 158, pp 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.08.057>.
- [14] Satpati, G. G., Gorain, P. C., Pal, R., (2016) Efficacy of EDTA and Phosphorous on Biomass Yield and Total Lipid Accumulation in Two Green Microalgae with Special Emphasis on Neutral Lipid Detection by Flow Cytometry, *Adv. Biol.*, 2016, pp 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/8712470>.
- [15] Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., Bux, F., (2015) Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology, *Biochem. Eng. J.*, 94, pp 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>.
- [16] Sonkar, S., Mallick, N., (2018) An alternative strategy for enhancing lipid accumulation in chlorophycean microalgae for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.*, 30(4), pp 2179–2192. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1419-0>.
- [17] Slade, R., Bauen, A., (2013) Microalgae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass and Bioenergy*, 53(0), pp 29–38.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>.

- [18] Brennan, L., Owende, P., (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14(2), pp 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- [19] Khan, S. A., Rashmi, Hussain, M. Z., Prasad, S., Banerjee, U. C., (2009) Prospects of biodiesel production from microalgae in India, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13(9), pp 2361–2372. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.005>.
- [20] Gómez, L. Ma., (2007) Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos, *Rev. Cuba. Química*, XIX(2), pp 03–19. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>.
- [21] Rendón, L. J., Ramírez, M. E., Vélez, Y., (2015) Microalgas para la industrial alimentaria.
- [22] Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances, *Plant J.*, 54(4), pp 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.
- [23] Hernández-Pérez, A., Labbé, J. I., (2014) Microalgas, cultivo y beneficios, *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 49(2), pp 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>.
- [24] Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14(1), pp 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- [25] Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., Brányik, T., (2014) Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae, *J. Appl. Phycol.*, 26(3), pp 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>.
- [26] Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quinta, I. D., López-Chuken, U. J., (2017) Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂, *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 52(3), pp 417–427. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>.
- [27] Battah, M., El-Ayoty, Y., Abomohra, A. E. F., El-Ghany, S. A., Esmael, A., (2015) Effect of Mn²⁺, Co²⁺ and H₂O₂ on biomass and lipids of the green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential candidate for biodiesel production, *Ann. Microbiol.*, 65(1), pp 155–162. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0846-7>.

- [28] Iriani, D., Suriyaphan, O., Chaiyanate, N., (2011) Effect of iron concentration on growth, protein content and total phenolic content of *Chlorella* sp. cultured in basal medium, *Sains Malaysiana*, 40(4), pp 353–358.
- [29] Barbera, E., Bertucco, A., Kumar, S., (2018) Nutrients recovery and recycling in algae processing for biofuels production, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 90(November 2017), pp 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.004>.
- [30] Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B. M., Characklis, G. W., Gerlach, R., (2014) Sources and resources: Importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(11), pp 4805–4816. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5694-7>.
- [31] Engin, I. K., Cekmecelioglu, D., Yücel, A. M., Oktem, H. A., (2018) Heterotrophic growth and oil production from *Micractinium* sp. ME05 using molasses, *J. Appl. Phycol.*, 30(6), pp 3483–3492. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1486-2>.
- [32] Howard, J., Rackemann, D. W., Bartley, J. P., Samori, C., Doherty, W. O. S., (2018) Conversion of Sugar Cane Molasses to 5-Hydroxymethylfurfural Using Molasses and Bagasse-Derived Catalysts, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 6(4), pp 4531–4538. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02746>.
- [33] Roukas, T., (1998) Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production, *Process Biochem.*, 33(8), pp 805–810. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00048-X).
- [34] Yan, D., Lu, Y., Chen, Y.-F., Wu, Q., (2011) Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production, *Bioresour. Technol.*, 102(11), pp 6487–6493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.036>.
- [35] Drapcho, C. M., Nhuan, N. P., Walker, T. H., (2008) Biofuels engineering process technology <https://doi.org/10.1036/0071487492>.
- [36] Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., Chen, F., (2012) Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*, *Bioresour. Technol.*, 107, pp 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.047>.
- [37] Li, X., Yang, W. L., He, H., Wu, S., Zhou, Q., Yang, C., Zeng, G., Luo, L., Lou, W., (2018) Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater, *Bioresour. Technol.*, 251, pp 274–279.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.058>.

- [38] Mondal, M., Ghosh, A., Tiwari, O. N., Gayen, K., Das, P., Mandal, M. K., Halder, G., (2017) Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes, *Energy Convers. Manag.*, 145, pp 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.05.001>.
- [39] Ancona-Canché, K., López-Adrián, S., Espinosa-Aguilar, M., Garduño-Solórzano, G., Toledano-Thompson, T., Narváez-Zapata, J., Valdez-Ojeda, R., (2017) Molecular phylogeny and morphologic data of strains of the genus *Coelastrella* (Chlorophyta, Scenedesmaceae) from a tropical region in North America (Yucatan Peninsula), *Bot. Sci.*, 95(3), pp 527. <https://doi.org/10.17129/botsci.1201>.
- [40] Lakshmana, S., Suja, C., Anantharaman, P., Kannan, K., Kathiresan, S., (2016) First record of *Coelastrella vacuolata* (Chlorophyta: Scenedesmaceae) in Tuticorin coast, Gulf of Mannar, *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, 16(3), pp 205–211. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1837>.
- [41] Uzunov, B. A., Stoyneva, M. P., Gärtner, G., Koeﬂer, W., (2008) First record of *Coelastrella* species (Chlorophyta: Scenedesmaceae) in Bulgaria, *Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck*, 95(June 2015), pp 27–34.
- [42] Luo, L., He, H., Yang, C., Wen, S., Zeng, G., Wu, M., Zhou, Z., Lou, W., (2016) Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater, *Bioresour. Technol.*, 216, pp 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.059>.
- [43] Abe, K., Takizawa, H., Kimura, S., (2004) Characteristics of Chlorophyll Formation of the Aerial Microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* and Its Application for Environmental Biomonitoring, 98(1), pp 34–39.
- [44] Hu, C., Chuang, L., Yu, P., Chen, C. N., (2013) Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50, *Food Chem.*, 138(4), pp 2071–2078. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.133>.
- [45] Neofotis, P., Huang, A., Sury, K., Chang, W., Joseph, F., Gabr, A., Twary, S., Qiu, W., Holguin, O., Polle, J. E. W., (2016) Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation, *Algal Res.*, 15, pp 164–178. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.007>.

- [46] Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Sashidhar, B., Adholeya, A., (2016) The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential, *Bioresour. Technol.*, 211, pp 556–565. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.121>.
- [47] Niemi, C., Lage, S., Gentili, F. G., (2019) Comparisons of analysis of fatty acid methyl ester (FAME) of microalgae by chromatographic techniques, *Algal Res.*, 39(February), pp 101449. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101449>.
- [48] Hartmann, A., Albert, A., Ganzera, M., (2015) Effects of elevated ultraviolet radiation on primary metabolites in selected alpine algae and cyanobacteria, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 149, pp 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.016>.
- [49] Durán, I., Rubiera, F., Pevida, C., (2018) Microalgae: Potential precursors of CO₂ adsorbents, *J. CO₂ Util.*, 26(March), pp 454–464. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.06.001>.
- [50] Tschalkner, A., Gärtner, G., Kofler, W., (2008) *Coelastrella aeroterrestica* sp. nov. (Chlorophyta, Scenedesmoideae) – a new, obviously often overlooked aeroterrestrial species, *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.*, 128(1), pp 11–20. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2008/0128-0011>.
- [51] Minyuk, G. S., Chelebieva, E. S., Chubchikova, I. N., Dantsyuk, N. V., Drobetskaya, I. V., Sakhon, E. G., Chivkunova, O. B., Chekanov, K. A., Lobakova, E. S., Sidorov, R. A., Solovchenko, A. E., (2016) pH and CO₂ effects on *Coelastrella* (*Scotiellopsis*) *rubescens* growth and metabolism, *Russ. J. Plant Physiol.*, 63(4), pp 566–574. <https://doi.org/10.1134/S1021443716040105>.
- [52] Mansur, D., Fitriady, M., Susilaningsih, D., Simanungkalit, S., (2014) Production of biodiesel from *Coelastrella* sp. microalgae, *Hem. Ind.*, 68(2), pp 213–232. <https://doi.org/10.2298/HEMIND130205046D>.
- [53] Karpagam, R., Jawaharraj, K., Ashokkumar, B., (2018) Unraveling the lipid and pigment biosynthesis in *Coelastrella* sp. M-60 : Genomics-enabled transcript pro fi ling, *Algal Res.*, 29(November 2017), pp 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.031>.
- [54] Addiel, J., Hernández-rojo, D., (2018) Comparación de crecimiento de *Scenedesmus* Sp. y *Berrocodesmus* Sp. mediante la adición de CO₂ de la fermentación alcohólica, 5(14), pp 22–27.

- [55] Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., Rodríguez-Núñez, J. R., (2017) Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas, *Hidrobiologica*, 27(3), pp 337–352.
- [56] Loera-quezada, M. M., Olgúin, E. J., Manejo, R. De, Recursos, B. De, Ecología, I. De, Carretera, a C. I. K., (2010) Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel : retos y oportunidades, *Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. y Algal*, 1, pp 91–116. <https://doi.org/00000-355>.
- [57] Ferro, L., Gentili, F. G., Funk, C., (2018) Isolation and characterization of microalgal strains for biomass production and wastewater reclamation in Northern Sweden, *Algal Res.*, 32(August 2017), pp 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.006>.
- [58] Gutiérrez, P., De la Vara, R., (2014) Análisis y diseño de experimentos.
- [59] Alam, M. A., Wu, J., Xu, J., Wang, Z., (2019) Enhanced isolation of lipids from microalgal biomass with high water content for biodiesel production, *Bioresour. Technol.*, 291(July), pp 121834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121834>.
- [60] Kirrolia, A., Bishnoi, N. R., Singh, R., (2014) Response surface methodology as a decision-making tool for optimization of culture conditions of green microalgae *Chlorella* spp. for biodiesel production, *Ann. Microbiol.*, 64(3), pp 1133–1147. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0752-4>.
- [61] Onumaegbu, C., Alaswad, A., Rodriguez, C., Olabi, A., (2019) Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology, *Renew. Energy*, 132, pp 1323–1331. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.09.008>.
- [62] Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., Chemat, F., (2012) “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process, *Bioresour. Technol.*, 114, pp 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.096>.
- [63] Nanduca, H., (2015) Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalgas *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- [64] Beza, B., (2018) Characterization and clarification of cane molasses to produce bakery yeast.
- [65] López, R., (2017) Potencial de cepas de microalgas aisladas de la costa de Yucatán para la

producción de biodiésel, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

- [66] Falcón, J., (2019) Producción de bioturnosina a partir de lípidos de *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing mediante hidroxigenación, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- [67] Serrano, M., (2017) Análisis del perfil lipídico de la microalga *Coelastrum* sp. para la producción de biocombustibles, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- [68] Manzoor, M., Jabeen, F., Thomas-Hall, S. R., Altaf, J., Younis, T., Schenk, P. M., Qazi, J. I., (2019) Sugarcane bagasse as a novel low/no cost organic carbon source for growth of *Chlorella* sp. BR2, *Biofuels*, 0(0), pp 1–7. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1580970>.
- [69] Arredondo, B., Voltolina, D., (2017) Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, La Paz, Baja California Sur.
- [70] Bower, S., Wickramasinghe, R., Nagle, N. J., Schell, D. J., (2008) Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.*, 99(15), pp 7354–7362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.045>.
- [71] Quan, Z.-X., Jin, Y.-S., Yin, C.-R., Lee, J. J., Lee, S.-T., (2005) Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal, *Bioresour. Technol.*, 96(15), pp 1690–1695. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.033>.
- [72] Mortensen, A., Larsen, J. C., (2012) Risk assessment of sweeteners used as food additives, *Sweeten. Nutr. Asp. Appl. Prod. Technol.*, pp 419–435. <https://doi.org/10.1201/b12065>.
- [73] Sun, N., Wang, Y., Li, Y. T., Huang, J. C., Chen, F., (2008) Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta), *Process Biochem.*, 43(11), pp 1288–1292. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.07.014>.
- [74] Liu, J., Huang, J., Fan, K. W., Jiang, Y., Zhong, Y., Sun, Z., Chen, F., (2010) Production potential of *Chlorella zofingiensis* as a feedstock for biodiesel, *Bioresour. Technol.*, 101(22), pp 8658–8663. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.082>.
- [75] Navarro, S., García, A. L., Sanchez, J., (2009) Aspectos del proceso hidrolítico ácido de proteínas, Univ. Murcia.

- [76] Rearick, D. E., (1995) Non-Sugar Removal in the molasses and Raw juice chromatographic separation processes, (Assbt), pp 1–5.
- [77] Meyer, J. H., Wood, R. A., (2001) The effects of soil fertility and nutrition on sugarcane quality: a review, Proc S Afr Sug Technol Ass, 75(March), pp 242–247.
- [78] Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y. E., Ozkan, A. D., (2012) Differential Effects of Nitrogen and Sulfur Deprivation on Growth and Biodiesel Feedstock Production of *Chlamydomonas reinhardtii*, 109(8), pp 1947–1957. <https://doi.org/10.1002/bit.24474>.
- [79] Andrade, M. R., Costa, J. A. V., (2007) Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate, Aquaculture, 264(1–4), pp 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.021>.
- [80] Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Esther Puente, M., (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella Vulgaris*, J. Phycol., 47(1), pp 190–199. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00934.x>.
- [81] Kim, S., Park, J. eun, Cho, Y. B., Hwang, S. J., (2013) Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions, Bioresour. Technol., 144, pp 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068>.
- [82] Valdez-Ojeda, R. A., del Rayo Serrano-Vázquez, M. G., Toledano-Thompson, T., Chavarría-Hernández, J. C., Barahona-Pérez, L. F., (2020) Effect of Media Composition and Culture Time on the Lipid Profile of the Green Microalga *Coelastrum* sp. and Its Suitability for Biofuel Production, Bioenergy Res. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10160-5>.
- [83] Wan, M. X., Wang, R. M., Xia, J. L., Rosenberg, J. N., Nie, Z. Y., Kobayashi, N., Oyler, G. A., Betenbaugh, M. J., (2012) Physiological evaluation of a new *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures, Biotechnol. Bioeng., 109(8), pp 1958–1964. <https://doi.org/10.1002/bit.24477>.
- [84] Kavanová, M., Lattanzi, F. A., Grimoldi, A. A., Schnyder, H., (2006) Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves, Plant Physiol., 141(2), pp 766–775. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079699>.
- [85] Baumgardt, F. J. L., Filho, A. Z., Brandalize, M. V., Da Costa, D. C., Antoniosi Filho, N. R., Abreu, P. C. O. V., Corazza, M. L., Ramos, L. P., (2016) Lipid content and fatty acid profile

of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids, *J. Supercrit. Fluids*, 108, pp 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.003>.

- [86] Mendoza, H., Carmona, L., Assunção, P., Freijanes, K., de la Jara, A., Portillo, E., Torres, A., (2015) Variation in lipid extractability by solvent in microalgae. Additional criterion for selecting species and strains for biofuel production from microalgae, *Bioresour. Technol.*, 197, pp 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.094>.
- [87] Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Bashan, Y., (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Res.*, 45(1), pp 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>.
- [88] Cheirsilp, B., Torpee, S., (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation, *Bioresour. Technol.*, 110, pp 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>.
- [89] Cagliari, A., Margis, R., Dos Santos Maraschin, F., Turchetto-Zolet, A. C., Loss, G., Margis-Pinheiro, M., (2011) Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae, *Int. J. Plant Biol.*, 2(1), pp 10. <https://doi.org/10.4081/pb.2011.e10>.

ANEXOS

Formulación del medio de cultivo TAP

Solución stock	Cantidad ml L ⁻¹	Componente	Concentración g L ⁻¹
Tris-base 1 M	20	Tris-base	121.14
Buffer fosfatos	1	K ₂ HPO ₄	108
		KH ₂ PO ₄	56
		H ₃ BO ₃	11.4
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22
		MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.06
Metales traza Hunter	1	FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.99
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.61
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1.1
		NH ₄ Cl	40
Solución A	10	MgSO ₄ · 7H ₂ O	10
		CaCl ₂ · 2H ₂ O	5
		Ácido acético glacial	1.049
Ácido acético glacial	1	CH ₃ COOH	1.049

Para preparar un litro de medio de cultivo TAP se toman 500 mL de agua destilada y se agregan las soluciones stock en las cantidades que se muestran en la columna 2 de la tabla siguiendo ese orden. Se afora hasta 1 L y se ajusta el pH a 7.0 con HCL 1N o KOH 1M, según sea el caso. Finalmente se esteriliza en autoclave a 120 °C, 15 psi por 20 minutos.

Para preparar medio de cultivo TAP sólido se agregan 7.0 g L⁻¹ de agar bacteriológico al medio con pH ajustado y se disuelve en placa de calentamiento con agitación rápida hasta quedar clarificado. Se esteriliza y se vierten de 10 a 15 mL del medio aún caliente en la caja Petri en campana de flujo laminar. Se deja evaporar el agua y sellar las cajas con plastificante