

## Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

# ANÁLISIS DEL PERFIL LIPÍDICO DE LA MICROALGA Coelastrum sp. PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Tesis que presenta

## MARÍA GUADALUPE DEL RAYO SERRANO VÁZQUEZ

En opción al título de

## MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, Julio de 2017

#### DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron otorgados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenece patrimonialmente al Centro de Investigación Científica A.C., y en el mismo tenor reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

> Mérida, Yucatán Julio de 2017

María Guadalupe del Rayo Serrano Vázquez

### AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca No. 338220.
- A Aeropuertos y Servicios Auxiliares (ASA) por financiar el proyecto de investigación mediante el fondo ASA – CONACYT No. 243145.
- A la Unidad de Energía Renovable y al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por las instalaciones prestadas y el apoyo otorgado.
- A mi asesor Luis Felipe Barahona Pérez por dirigir el presente proyecto de investigación.
- A mi comité tutorial integrado por los Dres. Ruby Valdez Ojeda, Luis Felipe Barahona Pérez y María del Pilar Sánchez Saavedra, por los conocimientos, asesoría y apoyo brindados.
- A los revisores de tesis: Dra. Virginia Herrera Valencia y Dr. Rodrigo Patiño Díaz, por sus consejos durante la revisión del documento.
- A la Q.I. Tanit Toledano Thompson por el apoyo técnico durante la ejecución de los experimentos.
- Al M.C. Martín Baas López y M.C. Jorge Domínguez Maldonado por su apoyo colaboración en la realización de los análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR).
- A mis amigas y amigos: a Diana Luna de León; Alicia y Mario Lobo de San Miguel de Allende. En Mérida a toda la mezcla cultural conformada por Anel, Vianney, Yaret, Paty, Lupita, Karen, Ixchel, Ricardo, Alexis, Rodrigo, David, Caleb, Andrés, Mintzirani, Hugo y Terrón. Todos ustedes me han impulsado, motivado y sido fuente de comprensión y alegría durante mis estudios de maestría. Sé que con todos ustedes cuento siempre y les agradeceré su compañía, paciencia y motivación, donde quiera que estemos.

#### DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con todo el cariño de mi coraxón, para mi familia: mi madre Lulú, mi padre Ansberte aunque no esté. A mis hermanos Victor Tito, Julio, Cuauhtémoc, Orlando, Alberto y Mary. A mis sobrinas y sobrino. Todos ustedes son mi motor, apoyo y paciencia que nunca se acaban. Aunque el tiempo y la distancia pesen, siempre me dan la libertad para dirigir mi embarcación y se alegraran por mis logros.

Gracias

DEDICATORIA	IV
LISTADO DE TABLAS	VII
LISTADO DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	2
ANTECEDENTES	2
<ul> <li>1.1 METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE LAS MICROALGAS</li> <li>1.2 SÍNTESIS DE COMPUESTOS MICROALGALES.</li> <li>1.3 LAS MICROALGAS COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES</li> <li>1.4 LÍPIDOS ALGALES</li> <li>1.4.1 Lípidos polares</li> <li>1.4.1.2 Glicosilglicéridos.</li> <li>1.4.1.3 Lípidos betaínicos</li> <li>1.4.2 Lípidos no polares o neutros.</li> <li>1.4.2.1 Triacilgliceroles.</li> <li>1.4.2.3 Hidrocarburos.</li> <li>1.4.2.4 Isoprenoides.</li> <li>1.5 GÉNERO COELASTRUM.</li> <li>1.6 CONDICIONES DE CULTIVO</li> <li>1.6.1.1 Agua residual como medio de cultivo para microalgas</li> <li>1.6.2 Fuente de carbono.</li> <li>1.6.3 Fuente de nitrógeno.</li> </ul>	2 2 5 5 7 7 7 7 7 7 10 11 12 16 17 18 19 20 22 23 24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
CAPÍTULO 2	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
<ul> <li>2.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</li> <li>2.2 MATERIAL BIOLÓGICO</li> <li>2.3 MEDIOS DE CULTIVO</li> <li>2.4 CULTIVO DE <i>COELASTRUM</i> SP.</li> <li>2.5 CONTEO CELULAR</li> <li>2.6 CURVAS DE CRECIMIENTO</li> </ul>	28 29 29 29 31 32
	JZ

### ÍNDICE

	<ul> <li>2.7 CULTIVO EN DOS ETAPAS</li> <li>2.8 RECUPERACIÓN DE LA BIOMASA</li> <li>2.9 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES</li> <li>2.10 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)</li> <li>2.11 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA (CC)</li> <li>2.12 TRANSESTERIFICACIÓN</li> <li>2.13 CROMATOGRAFÍA DE GASES- MASAS (CGM)</li> <li>2.14 ANÁLISIS DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DE LOS</li> </ul>	32 33 35 36 37 37
	FOSFOLÍPIDOS	38 38
С	APÍTULO 3	39
R	ESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
	<ul> <li>3.1 CRECIMIENTO DE COELASTRUM SP.</li> <li>3.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CONTENIDO LIPÍDICO</li></ul>	39 44 53 59 59 60 60 61 62
С	ONCLUSIONES	64
Pl	ERSPECTIVAS	65
	ANEXO I. FORMULACIONES DE AGUA RESIDUAL SINTÉTICA ANEXO II. FORMULACIÓN DEL MEDIO TAP ANEXO III. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA <i>COELASTRUM</i> SP. EN ARS <sub>A</sub> ANEXO IV. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA <i>COELASTRUM</i> SP. EN ARS <sub>P</sub> (SIN MELAZA) ANEXO V. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CONTENIDO LIPÍDICO DE LOS CULTIVOS ARS <sub>A</sub> Y AR	79 80 82 83 S <sub>P</sub> 84
	ANEXO VI. RELACIÓN DE PESO Y PORCENTAJE DE LAS FRACCIONES ARSA Y ARSP ELUIDAS	85

### LISTADO DE TABLAS

TABLA 1.1 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE ALTO VALOR DE ESPECIES DE MICROALGAS Y
APLICACIONES (TOMADO DE CUELLAR S. [18])
TABLA 1. 2 CONTENIDO LIPÍDICO EN MICROALGAS (TOMADO DE CHISTI Y. [25])
TABLA 1. 3 ÁCIDOS GRASOS DETECTADOS EN LAS FRACCIONES DE TRIACILGLICEROL Y DE LAS
FRACCIONES DE ÁCIDOS GRASOS EN EXTRACTOS LIPÍDICOS MICROALGALES (ADAPTADO DE
Рак М. [64])
TABLA 1. 4 BIOMASA Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS AISLADAS DE AGUA RESIDUAL
(TRATADA Y SIN TRATAR) DE LA INDUSTRIA DE ALFOMBRAS (ADAPTADO DE S. CHINNASAMY
ET AL. [99])
TABLA 1. 5 CARACTERÍSTICAS DE LA MELAZA DE CAÑA (ADAPTADO DE F. GHORBANI ET AL.
[111])
TABLA 1. 6 CONCENTRACIÓN DE LOS PRINCIPALES NUTRIENTES DE LA MELAZA (TOMADO DE H.
NANDUCA [87])
TABLA 2. 1       TIEMPO DE INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS       30
TABLA 3. 1         VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (M) Y CONCENTRACIÓN CELULAR AL FINAL DE LA FASE
EXPONENCIAL DE COELASTRUM SP. EN LOS CULTIVOS ARS <sub>P</sub> 15 y TAP1540
TABLA 3. 2         VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (M) Y CONCENTRACIÓN CELULAR AL FINAL DE LA FASE
EXPONENCIAL DE COELASTRUM SP. EN LOS CULTIVOS ARS <sub>P</sub> 7 y TAP5
TABLA 3. 3 CONCENTRACIÓN CELULAR DE COELASTRUM SP. AL FINAL DE LA FASE
ESTACIONARIA (15 DÍAS)
TABLA 3. 4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA SECA, PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y CONTENIDO LIPÍDICO
DE COELASTRUM SP
TABLA 3. 5 RELACIÓN DE PESO Y PORCENTAJE DE LAS FRACCIONES         49
TABLA 3. 6 COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE COELASTRUM SP.         55

### LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 EJEMPLOS DE LOS PRINCIPALES FOSFOGLICÉRIDOS DE ALGAS. PC	
FOSFATIDILCOLINA. PE FOSFATIDILETANOLAMINA Y PG FOSFATIDILGLICEROL [8]	3
FIGURA 1. 2 LA ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES GLICOSILGLICÉRIDOS DE ALGAS. R1 Y R2 SON	1
LAS DOS CADENAS DE ACILO GRASO. MGDG MONOGALACTOSILDIACILGLICEROL: DGDG	
DIGALACTOSILDIACILGICEROL: SQDG SULFOQUINOVOSILDIACILGLICEROL [8]	)
FIGURA 1. 3 PRINCIPAL LÍPIDO BETAÍNICO EN ALGAS. 1.2-DIACILGLICERIL-3-O-4'-(N.N.N-	
TRIMETIL)-HOMOSERINA (DGTS)	)
<b>FIGURA 1. 4</b> ESTRUCTURA DEL TRIACILGLICEROL, $R^1$ , $R^2$ Y $R^3$ SON CADENAS DE ÁCIDOS	
GRASOS (USUALMENTE DIFERENTES)	
FIGURA 2. 1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	3
FIGURA 2. 2 CULTIVO DE COELASTRUM SP. EN MEDIO TAP EN REACTORES CELSTIR DE 500 ML.	
30	)
FIGURA 2. 3 CÁMARA DE NUEBAUER	
FIGURA 2. 4 BIOMASA HÚMEDA RECUPERADA POR CENTRIFUGACIÓN: A) BIOMASA DE ARS	
DURANTE SU LAVADO; B) TRIPLICADO DE LA BIOMASA HÚMEDA DE ÁRS <sub>P</sub> 7	3
FIGURA 2. 5 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE SOLVENTES.	ł
FIGURA 2. 6 VIALES CON EXTRACTO LIPÍDICO SECO DEL CULTIVO TAP5	5
FIGURA 2. 7 TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	5
FIGURA 2. 8 SEPARACIÓN DEL EXTRACTO LIPÍDICO MEDIANTE COLUMNA CROMATOGRÁFICA 36	5
FIGURA 2. 9 TRANSESTERIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN CON TRIGLICÉRIDOS	,
FIGURA 3. 1 CURVAS DE CRECIMIENTO DE 15 DÍAS DE LA MICROALGA COELASTRUM SP	)
FIGURA 3. 2 PRECULTIVO DE COELASTRUM SP. EN ARSA (SIN MELAZA). SE OBSERVA UNA	
DECOLORACIÓN TOTAL DE LAS CÉLULAS MICROALGALES.	
FIGURA 3. 3 CULTIVO DE COELASTRUM SP. EN ARS <sub>P</sub> (SIN MELAZA): A) EL DÍA DE INOCULACIÓN,	
B) EL DÍA 6. AL INICIO DEL CULTIVO EL MEDIO QUE CONTIENE LAS CÉLULAS DE MICROALGAS	
ES VERDE, MIENTRAS QUE AL TRANSCURRIR LOS DÍAS TOMAN UNA COLORACIÓN CAFÉ 41	
FIGURA 3. 4 CURVAS DE CRECIMIENTO DE COELASTRUM SP. A 5 (TAP5) Y 7 DÍAS (ARS <sub>P</sub> 7) 42	)
FIGURA 3. 5 PLACAS OBTENIDAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LAS	
FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO DEL CULTIVO TAP15. CUADRO ROJO:	
HIDROCARBUROS; CUADRO AMARILLO: TRIGLICÉRIDOS, CUADRO VERDE: ESTEROLES Y	
ALCOHOLES GRASOS, CUADRO AZUL: TERPENOS Y CUADRO MORADO: FOSFOLÍPIDOS 46	;
FIGURA 3. 6 CINCO FRACCIONES RESULTANTES DE LA SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS	
LIPÍDICOS DEL EXTRACTO PROVENIENTE DEL CULTIVO EN TAP15	,
FIGURA 3. 7 PLACA CROMATOGRÁFICA DE LA FRACCIÓN DE TRIGLICÉRIDOS PROVENIENTE DEL	
CULTIVO ARSP. REF: FRACCIÓN ANTES DE TRANSESTERIFICAR. A: BIODIESEL OBTENIDO EN	
EL LABORATORIO. A2/L: FRACCIÓN TRANSESTERIFICADA	'
FIGURA 3. 8 PLACA DE LAS CINCO FRACCIONES FINALES PROVENIENTES DEL EXTRACTO $ARS_{P}$ -	
N. CUADRO AMARILLO: TRIGLICÉRIDOS EN EL EXTRACTO CRUDO; CUADRO ROJO:	
HIDROCARBUROS; CUADRO NARANJA: FAME; CUADRO VERDE: ESTEROLES Y ALCOHOLES	
GRASOS; CUADRO AZUL: TERPENOS Y CUADRO MORADO: FOSFOLÍPIDOS	3
FIGURA 3. 9 COMPOSICIÓN LIPÍDICA (VALORES ÚNICOS) DE LA MICROALGA COELASTRUM SP. EN	
LOS DIFERENTES CULTIVOS: TAP DE 15 DÍAS (TAP15); ARS <sub>P</sub> DE 15 DÍAS (ARS <sub>P</sub> 15); TAP	

DE 5 DÍAS (TAP5); ARS <sub>P</sub> DE 7 DÍAS (ARS <sub>P</sub> 7); ARS <sub>P</sub> DEFICIENTE DE NITRÓGENO (ARS	P-N)
Y TAP DEFICIENTE DE NITRÓGENO (TAP-N).	51
FIGURA 3. 10 CROMATOGRAMA CORRESPONDIENTE A LA FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS D	EL
CULTIVO EN ARS <sub>P</sub> 15. 31: CICLOTETRACOSANO; 53: ACETATO DE TRIACONTILO; 34: 1-	
HEPTACOSENO; 24: ESCUALENO	53
FIGURA 3. 11 ESPECTROS ATR-FTIR DE LAS FRACCIONES DE FOSFOLÍPIDOS EN LOS MEDIO	os
$ARS_P$ , $ARS_P7$ , TAP15, TAP5, $ARS_P15$ , $ARS_P-N$ , TAP-N Y $ARS_A$	62

#### RESUMEN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos capaces de almacenar energía en forma de lípidos, compuestos que han sido propuestos como fuente de energía alterna al petróleo. Los lípidos microalgales han sido estudiados para la obtención de biocombustibles, especialmente los triglicéridos para la producción de biodiesel. Sin embargo, las microalgas -dependiendo de la especie y condiciones de cultivo- sintetizan otros compuestos lipídicos que también tienen potencial para la generación de biocombustibles como bioturbosina y diésel verde. El potencial de la microalga Coelastrum sp. para producir lípidos se ha reportado con anterioridad. El objetivo del presente estudio fue analizar el perfil lipídico de la microalga Coelastrum sp. cultivada en agua residual sintética (ARS) con melaza y en medio TAP como referencia. El perfil lipídico se analizó al final de la fase exponencial (7 y 5 días para ARS y TAP respectivamente), al final de la fase estacionaria (ambos 15 días) y bajo un modelo de cultivo en dos etapas, en el cual, después de una etapa de crecimiento exponencial de 5 días se adicionaron nutrientes con excepción de la fuente de nitrógeno y se continuó el cultivo por 10 días adicionales, con el fin de inducir una mayor producción de lípidos. En el ARS con melaza en dos etapas, se obtuvo la mayor producción de biomasa en peso seco  $(4.2 \pm 0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$ . La biomasa obtenida en ARS con melaza, en cultivo por lotes de 15 días, fue menor  $(2.3 \pm 0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$  pero con mayor contenido lipídico (31% de la biomasa seca). En ambos casos (por lotes y en dos etapas) se produjeron principalmente triglicéridos, con perfiles de ácidos grasos en los que predominan compuestos C16 y C18 saturados y monoinsaturados, adecuados para la producción de biodiesel. También se encontraron hidrocarburos desde C24 a C32 y terpenos que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles como gasolina y bioturbosina. En conclusión, el cultivo de Coelastrum sp. en ARS con melaza, en un cultivo por lotes durante 15 días, favoreció su crecimiento y perfil lipídico.

#### ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms that store chemical energy under the form of lipids which are considered as an alternative source of energy to petroleum. The lipids from microalgae have been studied for biofuels production, particularly the triacylglicerides for biodiesel production. Nevertheless, depending on the species and culture conditions, microalgae can synthesize a variety of lipidic compounds that can be used to obtain other biofuels as biokerosene and green diesel. The potential oil production of the microalga Coelastrum sp. has been reported. In this study, the lipid profile of the microalga Coelastrum sp. cultivated in synthetic waste water (SWW) complemented with molasses was analyzed. TAP medium was used as reference. The lipid profiles at the end of the exponential growth, at the end of the stationary phase and under a two-step culture (in which after the exponential growth phase, nutrients were added with the exception of the nitrogen source and the culture continued for 10 days more) were analyzed. The higher biomass production was obtained when the microalga was cultured in SWW with molasses under a two-step culture: 4.2 g·L<sup>-1</sup>. Biomass production was lower: 2.3 g·L<sup>-1</sup> when the microalga was cultured in SWW with molasses for 15 days but a higher lipid content, 30% w/w, was attained. In both cultures, triacylglycerides were the main compounds produced. When analyzed as fatty acid methyl esters, they showed carbon chains of C16 and C18, saturated and insaturated, which are adequate for biodiesel production. C24 to C32 hydrocarbons and terpenes were also produced which can be used for the production of gasoline and biokerosene. In conclusion, the cultivation of the microalga Coelastrum sp. in batch culture with SWW and molasses for 15 days improved its growth and lipid profile.

#### INTRODUCCIÓN

La demanda de energía a nivel mundial aumenta constantemente, tal es el caso que se predice un incremento del 40% en la demanda global del petróleo para el 2025 [1]. En contraste, las reservas de petróleo crudo están disminuyendo puesto que es un recurso no renovable. Ante la disminución de los combustibles fósiles y el impacto ambiental que provocan en el planeta, el uso de combustibles alternos se vuelve necesario [1-3]. Existen diversas fuentes alternas para la generación de energía, tal como la biomasa, de la cual se utiliza la energía almacenada en forma de compuestos como almidón y/o grasas para la producción de biocombustibles. En este sentido, los aceites obtenidos a partir de palma, jatropha y microalgas han sido propuestos como materia prima. Sin embargo, las microalgas han recibido notable atención por su alta tasa fotosintética, estimada en 50 veces más alta comparada con la de las plantas terrestres [4]. Los lípidos (triglicéridos, isoprenoides, fosfolípidos y glicolípidos) son componentes importantes en las microalgas. Dependiendo de la especie y condiciones de crecimiento, del 2 al 60% del total de la materia seca celular son lípidos y están presentes en componentes de la membrana, metabolitos y productos de almacenamiento de energía [1]. Los triglicéridos y los ácidos grasos libres pueden ser convertidos en biodiesel mediante transesterificación [1, 5], aunque de estos se encuentra un pequeño porcentaje en la fracción lipídica microalgal, en comparación con la alta proporción de isoprenoides, glicolípidos, fosfolípidos y aromáticos [1]. Los terpenoides como el fitol producidos por plantas han cobrado interés como fuentes alternas para producir combustibles, como la gasolina [6]. Sin embargo, se ha reportado la síntesis de terpenoides también por microalgas [7]. Algunas especies microalgales también sintetizan y acumulan hidrocarburos [7, 8] que pueden ser utilizados para producir biocombutibles como el diésel verde. Es importante resaltar que la composición lipídica de las microalgas se ve determinada tanto por la especie como por las condiciones de cultivo.

*Coelastrum* sp. es una microalga cuya información acerca de su composición lipídica es escasa. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el perfil lipídico de la microalga *Coelastrum* sp. cultivada en Agua Residual Sintética (ARS) con melaza, medio eficiente para su crecimiento, en medio Tris Acetato Fosfato (TAP) como referencia y con deficiencia de nitrógeno en ambos medios de cultivo; para evaluar su potencial en la producción de biocombustibles.

## CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

#### 1.1 Metabolismo primario y secundario de las microalgas

El metabolismo es una red bioquímica compleja de vías biosintéticas que consiste en una serie de reacciones catalizadas por enzimas. Estas vías biosintéticas son para la producción de energía y supervivencia celular, en las cuales se sintetizan y utilizan macromoléculas (metabolitos primarios) para las funciones vitales de los organismos. A este tipo de procesos se le denomina metabolismo primario, que es básicamente el mismo en todos los tipos de células y organismos, entre ellos las microalgas [9, 10]. En la mayoría de los organismos ocurren además una serie de procesos anabólicos denominada metabolismo secundario en el que se producen compuestos que fungen como marcadores taxonómicos [9, 10] de familias y géneros [11]. A diferencia de los compuestos derivados del metabolismo primario, los metabolitos secundarios no son directamente requeridos para asegurar la vida y crecimiento de las células (organismos) que los producen [9, 10, 12], pero juegan un papel en la interacción de la célula con su ambiente, asegurando la sobrevivencia del organismo en el ecosistema [9]. Estos compuestos secundarios como los policétidos, alcaloides, lípidos, terpenos, esteroles y aminoácidos modificados son activados solamente durante etapas particulares de crecimiento y desarrollo [9] y su estructura básica es marcador del filo [11]. Muchos microorganismos como bacterias del suelo, hongos y microalgas pueden producir un amplio rango de metabolitos secundarios [9, 12, 13].

#### 1.2 Síntesis de compuestos microalgales

El término microalga se refiere en el sentido estricto a las algas microscópicas y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas (cianobacterias). En cuanto a su organización celular, ésta puede ser unicelular, colonial y filamentosa [14].

Las microalgas son microorganismos eucariotas y procariotas fotosintéticos, los cuales son ubicuos y exhiben una notable plasticidad metabólica, diversidad de formas y funciones ecológicas. Las microalgas pueden crecer rápidamente con simples

requerimientos (luz, fuente de carbono, CO<sub>2</sub>, nitrógeno, fósforo y potasio) y sobrevivir a un amplio espectro de ambientes extremos (calor, frío, sequía, salinidad, foto-oxidación, anaerobiosis, presión osmótica y radiación UV) debido a su estructura celular simple. Debido a su diversidad metabólica, las microalgas son una fuente de múltiples productos con propósitos farmacéuticos, cultivos alimenticios (consumo humano y animal) y como materia prima para producir combustibles renovables. Esto último debido a que pueden producir lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en periodos cortos de tiempo [15-21].

Además de los compuestos mencionados, las microalgas son capaces de sintetizar otros como los carotenoides (Tabla 1.1) [18, 22, 23], cuya síntesis es dependiente de la especie se presenta en diferente medida y dependiendo de la especie, etapa de crecimiento y condiciones naturales o artificiales [24-26].

**Tabla 1. 1** Extracción de compuestos de alto valor de especies de microalgas yaplicaciones (Tomado de Cuellar S. [18]).

Especies	Producto	Áreas de aplicación
Chlorella vulgaris	Biomasa, pigmentos	Productos naturales,
Chlorella sp.		alimentaria.
Chlorella ellipsodea		
Coccomyxa acidophila	Luteína, β-caroteno	Farmacéutica, nutrición
Coelastrella striolata var.	Cantaxantina, astaxantina,	Farmacéutica, nutrición,
multistriata	β-caroteno	cosmética
Crypthecodinium cohnii	Ácido docosahexaenoico	Farmacéutica, nutrición
Diacronema vlkianum	Ácidos grasos	Farmacéutica, nutrición
Dunaliella salina	Carotenoides, β-caroteno	Productos naturales, alimentaria
Galdiera suphuraria	Ficocianina	Farmacéutica, nutrición
Haematococcus pluvialis	Carotenoides, astaxantina,	Productos naturales,
Isochrysis galbana		Farmacéutica nutrición
isociii ysis galoana	carotenoides fucoxantina	cosmética alimentaria
Lvnabva maiuscula	Inmunomoduladores	Farmacéutica, nutrición
Muriellopsis sp.	Luteína	Farmacéutica, nutrición
Nannochloropsis gaditana	Ácido eicosapentaenoico	Farmacéutica, nutrición
Nannochloropsis sp.	•	
Odontella aurita	Ácidos grasos	Farmacéutica, cosmética, alimentaria
Parietochloris incisa	Ácido araquidónico	Alimentaria
Phaedactylum tricornutum	Lípidos, ácido eicosapentaenoico, ácidos grasos	Nutrición, producción de combustible
Porphyridium cruentum	Ácido araquidónico, polisacáridos	Farmacéutica, cosmética, nutrición
Scenedesmus almeriensis	Luteína, β-caroteno	Farmacéutica, nutrición, cosmética
Schizochytrium sp.	Ácido docosahexaenoico	Farmacéutica, nutrición
Spirulina platensis	Ficocianina, ácido r- linolénico, proteína de la biomasa	Productos naturales, cosmética
Ulkenia sp.	Ácido docosahexaenoico	Farmacéutica, nutrición

#### 1.3 Las microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles

Las algas, particularmente las microalgas verdes [27], son potencialmente útiles para la producción de biocombustibles, generación de calor y electricidad [1]. Algunos de los combustibles que se pueden obtener son: hidrocarburos que no contienen oxígeno sino carbono e hidrógeno, para la producción de gasolina, diésel y keroseno. El biodiesel se produce a partir de los triglicéridos y ácidos grasos libres presentes en los lípidos. El etanol se genera con los carbohidratos, que típicamente son mezclas complejas de mono-, poli y oligosacáridos con pentosas y hexosas; asimismo se encuentra celulosa y glicoproteínas en las paredes celulares. El hidrógeno es producido por ciertas especies microalgales mediante la fermentación oscura y fotofermentación de materiales orgánicos y fotólisis del agua. Por otra parte, el biogás y biometano se obtienen mediante la digestión de la biomasa microalgal a través de bacterias en digestores anaerobios. El bioaceite y biogás de síntesis son derivados del procesamiento de la biomasa a altas temperaturas en ausencia de oxígeno; mientras que el dimetil éter (DME) es un combustible sintético derivado del carbón, gas natural o biomasa [1]. Aunado a la producción de los biocombustibles posibles, el cultivo de las microalgas contribuye a la estabilización de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y a la disminución de los impactos del calentamiento global [1, 28-30].

Aunque las microalgas se han estudiado para generar diferentes biocombustibles de tercera generación, el interés se ha centrado principalmente en la investigación y desarrollo de biodiesel a partir de los lípidos microalgales [31]. Esto debido a que las microalgas presentan altas velocidades de crecimiento y sintetizan grandes cantidades de lípidos [24, 32-34]. El contenido de lípidos varía dependiendo de la especie y condiciones de cultivo, por lo cual presentan desde 2% hasta 60% de lípidos [1]; aunque algunas especies pueden exceder del 80% en peso seco [1, 25, 35, 36]. En la Tabla 1.2 se presenta el contenido lipídico registrado para algunas especies de microalgas.

Especie de microalga	Contenido de lípidos (% peso seco)
Botryococcus braunii	25-75
Chlorella sp.	28-32
Crypthecodinium cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16-37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25-33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20-35
Nannochloropsis sp.	31-68
Neochloris oleoabundans	35-54
Nitzschia sp.	45-47
Phaeodactylum tricornutum	20-30
Schizochytrium sp.	50-77
Tetraselmis suecica	15-23

Tabla 1. 2 Contenido lipídico en microalgas (tomado de Chisti Y. [25]).

La fracción de triglicéridos y ácidos grasos libres puede ser convertida en biodiesel mediante transesterificación [1, 25, 37-40]. No obstante, aunque una de las mayores fuentes de biocombustibles son los glicéridos, la conversión de los lípidos microalgales puede representar un reto debido a su complejidad [41]. Esto debido a que además de los triglicéridos, se encuentran otros compuestos como isoprenoides, glicolípidos, fosfolípidos, aromáticos y una amplia variedad de esteroles (ergosterol y sitosterol), cuya presencia puede ocasionar problemas en el procesamiento por transesterificación convencional o hidrotratamiento de la materia prima [1, 41].

Los terpenoides (provenientes de plantas) han sido utilizados desde tiempos antiguos a nivel industrial para la fabricación de productos farmacéuticos, sabores, fragancias, pesticidas y desinfectantes, entre otros. Sin embargo, también podrían considerarse como materia prima para el desarrollo de biocombustibles [42]. Esto debido a que el aceite con contenido de esteroles puede ser procesado por craqueo catalítico para producir un combustible con alta densidad energética, alto punto de inflamación y alta proporción del

compuesto con número de cetano elevado [41]; tal como se hizo con el alcohol diterpeno denominado fitol, mediante el cual se obtuvo un producto que cumple con los requisitos de ASTM (American Society for Testing and Materials) para gasolina [6].

#### 1.4 Lípidos algales

Los lípidos algales pueden ser divididos en dos grupos principales: lípidos polares (fosfoglicéridos o fosfolípidos y glicosilglicéridos) y lípidos no polares o neutros (acilgliceroles, esteroles, ácidos grasos libres [no esterificados], hidrocarburos, ceras y ésteres de esterilo) [8, 24, 43]. Los fosfoglicéridos, glicosilglicéridos y esteroles son componentes estructurales esenciales de las membranas biológicas, mantienen funciones específicas de la membrana y proveen permeabilidad con el medio circundante y entre organelos al interior de las células. También son la matriz de varios productos metabólicos. Por su parte, los lípidos no polares principalmente triacilgliceroles (TAG) o triglicéridos son productos de almacenamiento que la célula puede catabolizar para la obtención de energía [8, 44, 45].

#### 1.4.1 Lípidos polares

#### 1.4.1.1 Fosfolípidos

La estructura básica de los fosfolípidos es el grupo principal glicerol, derivado metabólicamente del glicerol 3-fosfato, el cual es esterificado hidrofóbicamente con grupos acilo en las posiciones 1 y 2. El fosfato es esterificado en la posición sn-3 (C-3) con un enlace adicional a la base de un grupo hidrofílico [8, 46]. Dependiendo de la especie y condiciones de cultivo, los fosfolípidos pueden representar del 8 al 47% de la fracción lipídica total de las algas [47, 48].

Los principales fosfolípidos identificados en la mayoría de las especies de algas son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilglicerol (PG) (Figura 1.1) [8].



**Figura 1. 1** Ejemplos de los principales fosfoglicéridos de algas. PC fosfatidilcolina, PE fosfatidiletanolamina y PG fosfatidilglicerol [8].

Los fosfolípidos de la microalga marina *Nannochloropsis* sp. representaron el 12.6% de los lípidos totales. Entre los fosfolípidos producidos se identificaron principalmente PC con un 40.5%; asimismo, se identificaron cantidades significativas de Fosfatidilinositol (PI) y Lisofosfatidilcolina (LPC) con 22 y 8.3%, respectivamente [7]. El PG es uno de los principales componentes de los lípidos en los cloroplastos, se identificó un 23% de los fosfolípidos en la especie microalgal antes mencionada. La especie de agua dulce *Scenedesmus* sp. — relacionada filogenéticamente con el género *Coelastrum* [49]— produjo el 32% del fosfolípido PG, aunque los fosfolípidos representaron únicamente el 0.34% de los lípidos totales [7]. Por otra parte, en *Dunaliella parva* se han identificado PI (2 mol%), PG (6 mol%) y en mayor porcentaje PC con 9 en mol % de los lípidos polares totales. En *Chlamydomonas reinhardtii* se identificaron PI (2 mol%), PE (5 mol%) y en mayor proporción PG con 10 mol %. Por otra parte, *Acetabularia mediterránea* produjo las menores cantidades de PI y PE con 1 mol %. Finalmente, en *Nannochloropsis* sp. se identificó la presencia de PI (6 mol%), PG (10 mol%), PE (6 mol%) y el mayor contenido de PC con 17 mol % [50].

#### 1.4.1.2 Glicosilglicéridos

Los glicosilglicéridos, también denominados glicolípidos, son caracterizados por una fracción 1, 2- diacil-sn-glicerol con un mono u oligosacárido unido a la posición sn-3 (C-3) del glicerol [8]. En los cloroplastos de algas y microalgas se pueden encontrar como principales componentes lipídicos los siguientes: monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) y sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) (Figura 1.2) [7, 8, 51]; en cantidades de 40-55%, 15-35% y 10-20% respectivamente [8, 52].



**Figura 1. 2** La estructura de los principales glicosilglicéridos de algas. R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son las dos cadenas de acilo graso. MGDG monogalactosildiacilglicerol; DGDG digalactosildiacilgicerol; SQDG sulfoquinovosildiacilglicerol [8].

La microalga *Scenedesmus* sp. — relacionada filogenéticamente con el género *Coelastrum* [49]— presentó 54% de MGDG, 37% de DGDG y sólo el 9% de SQDG respecto a los glicolípidos obtenidos, cuyo contenido correspondió al 0.35% de los lípidos totales. Lo anterior, conforme al estudio realizado con las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Schizochytrium limacinum*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y *Chlamydomonas reinhardtii*, [7].

Los glicolípidos contribuyen al mantenimiento de la estabilidad de la membrana celular, así como la actividad funcional de las proteínas. Sin embargo, el contenido y composición de los glicolípidos afectan sus propiedades. Por ejemplo, las características de la bicapa dependen del grado de saturación y la longitud de cadena de los ácidos grasos, los cuales pueden ser muy variados [53]. Los galactolípidos de los plastidios son caracterizados por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el MGDG; mientras que el SQDG contiene generalmente ácidos grasos saturados como el ácido palmítico [52].

#### 1.4.1.3 Lípidos betaínicos

Los lípidos betaínicos tienen una fracción betaína como grupo polar, la cual está unida a la posición sn-3 de glicerol mediante un enlace éter y las fracciones de ácidos grasos unidas a las posiciones sn-1 y 2. No contiene ni fósforo ni sacáridos. Los tres tipos de lípidos betaínicos identificados en algas corresponden a 1,2-diacilgliceril-3-O-4'-(N,N,N-trimetil)-homoserina (DGTS) (Figura 1.3); 1,2-diacilglicerin-3-O-2'-(hidroximetil)-(N,N,N-trimetil)- $\beta$ -alanina (DGTA); y 1,2-diacilgliceril-3-O-carboxi-(hidroximetil)-colina (DGCC) [8, 54].



**Figura 1. 3** Principal lípido betaínico en algas. 1,2-diacilgliceril-3-O-4'-(N,N,N-trimetil)homoserina (DGTS).

El DGTS ha sido reportado como un componente principal de algas verdes de agua dulce [7, 52], mientras que el DGTA parece ser característico de algas cafés (*Cryptomonas* y *Ochromonas*) [52, 54, 55]. El DGCC es uno de los constituyentes comunes en macroalgas marinas de la clase *Haptophyceae* [56].

#### 1.4.2 Lípidos no polares o neutros

#### 1.4.2.1 Triacilgliceroles

Los triacilgliceroles (TAG) son tri-ésteres de ácidos grasos y glicerol (Figura 1.4). Dada la asimetría rotacional en la molécula del glicerol, cada carbón es distinto, así como la posición de los ácidos grasos ( $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$ ) [52]. Los TAG son productos de almacenamiento en muchas especies de microalgas, acumulados en niveles variables. Cuando disminuye el crecimiento microalgal disminuye también la síntesis de nuevos componentes de membrana; por lo tanto, los ácidos grasos son empleados para la síntesis de TAG [8].



**Figura 1. 4** Estructura del triacilglicerol.  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son cadenas de ácidos grasos (usualmente diferentes).

La generación de triglicéridos en microalgas es controlada por la composición genética del organismo individual. Sin embargo, las algas oleaginosas producen pequeñas cantidades de TAG (20-50% en peso seco) bajo condiciones óptimas de crecimiento o condiciones ambientales favorables [51]. No obstante, las microalgas pueden ser inducidas para sintetizar y acumular altas proporciones de TAG [57], bajo condiciones ambientales desfavorables o condiciones de estrés durante el crecimiento, que alteran las vías biosintéticas de lípidos hacia la formación y acumulación de triacilglicerol, incrementando su contenido hasta el 80% de los lípidos totales [51, 58].

Los ácidos grasos que conforman los TAG así como los lípidos inusuales producidos por microalgas, se distinguen de los producidos por las plantas superiores [7]. Los TAG de microalgas se caracterizan generalmente por contener ácidos grasos saturados y monoinsaturados, comúnmente con una longitud de cadena en un rango de C16 a C18 [7, 8, 51].

#### 1.4.2.2.- Perfil de ácidos grasos

La transesterificación de los TAG se realiza para la obtención de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos, principales componentes del biodiesel. Las propiedades del biodiesel son determinadas en gran medida por la estructura de sus ésteres de ácidos grasos. Asimismo, el perfil de ácidos grasos corresponde con el del aceite o grasa del que proviene [59].

El perfil de ácidos grasos de un amplio rango de especies de microalgas, incluye ácidos grasos C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3 [60]. Para microalgas de los géneros *Desmodesmus, Coelastrum y Scenedesmus* el perfil de ácidos grasos se encuentra compuesto por esos ácidos grasos en un contenido que va del 80 al 90% de los ácidos grasos totales. En el caso de *Coelastrum* sp. cultivada en medio TAP se reportaron principalmente ácidos grasos C18:2, C18:1 y C16:0 con 35.69, 31.28 y 28.87%, respectivamente [49]. Para *Coelastrum asteroidum* se ha reportado una concentración aproximada de C16:0 y C18:1 correspondiente al 80%, bajo suministro de CO<sub>2</sub> de 0.03 a 0.2% [61]. Para *Coelastrum microporum* el contenido de los ácidos grasos C18:1 y C16:0

fue de 44.24 y 25.66 % [62], mientras que para la especie marina *Coelastrum* sp. los mismos constituyeron el 82.49% (56.63 y 25.86%, respectivamente) [63]. En cuanto al perfil de ácidos grasos de la especie *Scenedesmus* sp., se encontró compuesto principalmente por C18:3 (33.2%), C18:2 (17.4%), C18:1 (16%) y C16:0 (15.8%) en la fracción de TAG, mientras que sumaron 81% en la fracción de ácidos grasos libres [7]. En un estudio en que se identificaron morfológicamente especies de microalgas pertenecientes a la familia *Scenedesmaceae*, la mayoría presentó como ácidos grasos más abundantes (90% de los FAME totales): ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3); conteniendo del 20 al 30% de ácidos grasos saturados C16. Este perfil de ácidos grasos fue considerado adecuado para la producción de biodiesel [31].

En la tabla 1.3 se presentan los ácidos grasos detectados en las fracciones de TAG y ácidos grasos libres de ocho especies de microalgas de agua dulce, que incluyen especies del género *Scenedesmus* [64].

 Tabla 1. 3 Ácidos grasos detectados en las fracciones de triacilglicerol y de las fracciones de ácidos grasos en extractos lipídicos microalgales (adaptado de Paik M. [64]).

				% del área de	el pico principa	al <sup>a</sup>		
Ácido graso	Especies microalgales							
<b>J</b>	Chlorella vulgaris	Selenastrum minutum	Scenedesmus dimorphus	Ankistrodesmus braunii	Kirchneriella cornutac	Nannochloris sp.	Haematococcus pluvialis	Scenedesmus subspicatus
Fracción de triacil	glicerol							
Ácido caprílico (C8:0)	0.009	0.006	0.006	0.010	0.007	0.012	0.010	0.007
Ácido cáprico (C10:0)	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND	0.007	ND	ND	ND
Ácido láurico (C12:0)	0.012	0.012	0.009	0.011	0.011	0.022	0.021	0.009
Ácido mirístico (C14:0)	0.028	0.037	0.039	0.024	0.033	0.047	0.047	0.020
Ácido palmitoleico (C16:1)	0.049	0.025	0.025	0.038	0.014	0.087	0.059	0.022
Ácido palmítico (C16:0)	0.790	1.638	0.855	0.464	0.564	1.340	0.815	0.374
Ácido linoleico (C18:2 <i>n</i> -6c)	0.381	0.559	0.213	0.122	0.145	0.680	0.581	0.305
Ácido oleico (C18:1 <i>n</i> -9c)	0.203	1.835	1.135	0.383	0.791	1.042	0.156	0.164
Ácido α- linolenico (C18:3 <i>n</i> -3)	1.225	0.513	0.726	0.716	0.138	0.629	0.397	0.373
Ácido esteárico (C18:0)	0.143	0.341	0.124	0.107	0.148	0.239	0.189	0.118
Ácido eicosenoico (C20:1)	ND	0.019	ND	ND	0.013	ND	ND	ND
Ácido araquidónico	0.019	0.022	0.016	0.016	0.021	0.021	0.023	0.014

(C20:0)								
Ácido behénico (C22:0)	0.035	0.041	0.033	0.043	0.051	0.040	0.055	0.033
Total de ácidos grasos	2.894	5.048	3.181	1.934	1.943	4.159	2.353	1.439
Fracción de ácidos	Fracción de ácidos grasos							
Ácido caprílico (C8:0)	0.004	0.003	0.009	0.002	0.003	0.006	0.007	0.003
Ácido cáprico (C10:0)	0.017	0.032	ND	ND	ND	0.026	0.024	ND
Ácido laurico (C12:0)	0.010	0.011	0.018	0.005	0.006	0.018	0.009	0.005
Ácido mirístico (C14:0)	0.011	ND	0.021	ND	0.014	0.020	0.012	0.013
Ácido palmitoleico (C16:1)	ND	ND	ND	ND	ND	0.031	0.032	ND
Ácido palmítico (C16:0)	0.172	0.284	ND	0.134	0.277	0.505	0.726	0.393
Ácido linoleico (C18:2 <i>n</i> -6c)	0.044	0.059	0.022	ND	0.037	0.103	0.214	0.247
Ácido oleico (C18:1 <i>n</i> -9c)	0.034	0.137	0.149	0.066	0.206	0.236	0.063	0.159
Ácido α- linolénico (C18:3 <i>n</i> -3)	0.146	ND	0.089	0.027	ND	ND	ND	ND
Total de ácidos grasos libres	0.438	0.526	0.308	0.234	0.543	0.945	1.087	0.820

<sup>a</sup> Respecto al estándar interno en 30 μg del extracto lipídico total. <sup>b</sup> ND: No detectado.

La definición de la composición de ácidos grasos óptima en función a las propiedades requeridas para combustibles, no es factible. Sin embargo, en el caso del biodiesel, se sabe que debería contener niveles relativamente bajos de ácidos grasos saturados (para minimizar problemas de fluido en frío), bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (para disminuir la inestabilidad oxidativa) y por lo tanto, altos niveles de ácidos grasos monoinsaturados (destacan ácido palmitoléico [C16:1] y ácido oleico [C18:1]) [65].

#### 1.4.2.3 Hidrocarburos

Algunas microalgas también se caracterizan por su capacidad para sintetizar y acumular una cantidad significativa de hidrocarburos. Una de las especies más prometedoras es *Botryococcus braunii*, una microalga verde de agua dulce reconocida por su potencial como fuente renovable para producir hidrocarburos líquidos [8]. Su contenido de hidrocarburos oscila de 25-40 % de la biomasa seca [66], e incluso puede llegar a almacenar hasta 86 % de su peso seco [67]. Los hidrocarburos presentan diversas estructuras dependiendo de la raza, en este sentido, *B. braunii* ha sido clasificada en razas A, B y L de acuerdo al tipo de hidrocarburos sintetizados. La raza A produce hidrocarburos no isoprenoides dienos y trienos, n-alcadienos impares, mono-, tri, tetra y pentaenos de C25 a C31, los cuales son derivados de ácidos grasos. La raza B produce hidrocarburos isoprenoides de C30 a C37 altamente insaturados denominados botryococcenos y pequeñas cantidades de escualenos metil ramificados. La raza L produce un hidrocarburo tetraterpenoide simple conocido como licopadieno [8, 66-68].

Para *Coelastrum asteroidum* se ha reportado la presencia principalmente de alcanos de cadena C16 (11.26 %), C17 (11.05 %), C18 (13.69 %), C19 (10.95 %) y C20 (13.00 %) respecto a la fracción de hidrocarburos totales [69]. También se han identificado hidrocarburos entre los principales componentes de la materia insaponificable de los lípidos de otras microalgas verdes tanto de agua dulce como de agua salada. La especie *Scenedesmus* sp. presentó 21% de hidrocarburos de los cuales el 63% correspondía a  $C_{25}H_{50}$  y 22% a  $C_{25}H_{48}$ . El extracto de *Nannochloropsis* sp. presentó un contenido de 13% de hidrocarburos entre los que destacan  $C_{27}H_{52}$  (20%) y  $C_{30}H_{44}$  (18%) [7].

#### 1.4.2.4 Isoprenoides

Los isoprenoides (también conocidos como terpenoides) son compuestos ubicuos encontrados en todos los organismos vivos. Son considerados uno de los más grandes grupos de componentes naturales y tienen una variedad de funciones importantes en el metabolismo primario de plantas terrestres y algas verdes [70, 71]. Los más de 23,000 isoprenoides conocidos pueden ser clasificados, acorde al número de unidades C<sub>5</sub> derivadas del isopentenil difosfato (IPP), en varios grupos incluyendo monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) y diterpenos ( $C_{20}$ ) [72]. Entre los principales isoprenoides primarios con funciones importantes y conservadas en todas las algas eucariotas se encuentran los esteroles [70]. Éstos, como componentes esenciales de las membranas de todos los organismos eucariotes se encuentran diversamente distribuidos en las microalgas correspondiendo al gran número de clases, géneros y especies de las mismas. Algunos aparecen de manera generalizada y otros parecen estar restringidos sólo a ciertas clases de ellas [7, 73, 74]. Por ejemplo, en las microalgas verdes Chlamydomonas reinhardtii, Chlorella vulgaris, Nannochloropsis sp. y Scenedesmus sp. los esteroles representaron del 8 a 35 % de los compuestos Insaponificables (23% para Scenedesmus). Schizochytrium limacinum presentó una composición de 90% de esteroles a pesar de que sus compuestos insaponificables representaron solamente el 2% de sus lípidos totales [7].

Los fitoesteroles son esteroles derivados de plantas, siendo los principales el  $\beta$  -Sitosterol (más abundante), el estigmasterol y el campesterol [75, 76]. En el caso de extractos de las microalgas de agua salada *Nannochloropsis* sp. y *S. limacinum* fueron ricos en colesterol, mientras que en los de las microalgas de agua dulce se detectó la presencia de fitoesteroles C28-C30, predominando el ergosterol en C. *reinhardtii* y C. *vulgaris;* y el condrilasterol en *Scenedesmus* sp. (68.1%) [7].

Los metabolitos primarios de fotótrofos eucariotas incluyen otros isoprenoides como el fitol [70], un alcohol diterpénico que constituye la cadena hidrocarbonada de la clorofila [7, 77, 78]. Su presencia puede ser atribuida a la degradación de la clorofila durante la saponificación de los lípidos totales [77]. Se han encontrado altas cantidades de fitol en extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* (80 a 83%, respectivamente)

de los compuestos insaponificables. Mientras que los de *Nannochloropsis* sp. y *Scenedesmus* sp. presentaron cantidades que oscilan del 40 al 50% [7].

#### 1.5 Género Coelastrum

La selección de la especie de microalga es un factor importante para tener éxito en la producción de biocombustibles a partir de microalgas [16]. Algunos de los factores para la selección de la cepa son: rápida velocidad de crecimiento, contenido lipídico, la composición tanto de los lípidos totales como de los TAG y ácidos grasos libres, resistencia a los cambios en las condiciones ambientales, requerimiento de nutrientes, entre otros factores [1, 79, 80].

El género *Coelastrum* pertenece a la subfamilia Coelastroideae de la familia Scenedesmaceae; junto con los géneros *Coelastrella*, *Hariotina*, *Asterarcys* y *Dimorphococcus* [81]. De acuerdo a la literatura, la microalga *Coelastrum* sp. es potencialmente útil para producir lípidos [30] y ha mostrado tener potencial económico como materia prima para la producción de biocombustible debido al alto rendimiento de lípidos y al perfil de ácidos grasos adecuado [63]. Aunado a lo anterior, contribuye en la remediación de los problemas asociados con los gases de efecto invernadero, debido a su mecanismo de absorción de CO<sub>2</sub> atmosférico [30].

Se ha reportado la producción de biomasa de la cepa del género *Coelastrum*, la cual corresponde aproximadamente a 700 mg·L<sup>-1</sup> sin limitación de nitrógeno y 1,400 mg·L<sup>-1</sup> al final de la limitación de Nitrógeno en medio TAP; este último dato fue superior a lo generado por especies de los géneros *Scenedesmus* y *Desmodesmus* (280 - 680 mg·L<sup>-1</sup> antes de la limitación y 900 – 1210 mg·L<sup>-1</sup> después). Asimismo, presentó el contenido lipídico más alto, correspondiente al 48% en peso seco de la biomasa (w/w) [49]. El contenido lipídico obtenido fue más alto que el reportado para *Coelastrum microporum* con 21.54% (w/w) [62], *Coelastrum asteroidum* con 18.61% [61] y una cepa marina de *Coelastrum* sp. que contenía alrededor de 43.2% (w/w). El perfil de ácidos grasos de la especie marina se encontró conformado por 30.13% de ácidos grasos saturados y 69.87% de ácidos grasos insaturados, siendo los principales: ácido oleico C18:1 (56.6%),

ácido palmítico C16:0 (25.9%) y ácido hexadecenoico C16:1 (5.5%), los cuales constituyen un perfil lipídico adecuado para la producción de biocombustibles, específicamente biodiesel [63].

#### **1.6 Condiciones de cultivo**

El crecimiento de la microalga, la actividad metabólica y su composición celular son afectados por diversos factores ambientales [82], tales como oxígeno disuelto, concentración de CO<sub>2</sub>, iluminación, fuente y concentración de nitrógeno, temperatura, salinidad, pH, nutrientes, etapa de crecimiento y si su metabolismo es fotótrofo o heterótrofo [4, 16, 73, 82-85]. Sin embargo, las microalgas tienen la capacidad para adaptarse a diferentes condiciones naturales y artificiales en las cuales aumenta su producción de proteínas, carbohidratos y lípidos [24]. En este sentido, para que las microalgas sean consideradas como materia prima factible para la producción de biocombustibles, se busca el incremento en la productividad lipídica, lo cual contribuye a la reducción de los costos de producción [4]. La cantidad, calidad y productividad de los lípidos dependerán de la especie y de las condiciones de cultivo [86]. Algunas especies de microalgas producen naturalmente altos contenidos de lípidos (20-50% en peso seco), sin embargo, es posible incrementar su concentración mediante la optimización de factores de crecimiento determinantes como el nivel de nitrógeno, intensidad lumínica, temperatura, entre otros [16, 85]. El incremento en la producción de biomasa y lípidos hasta 10 veces, se puede lograr mediante el cultivo en dos etapas. En la primera etapa se obtiene el incremento en la tasa de reproducción celular aumentando el número de células, y en la segunda se incrementa el contenido de lípidos al ser prioritario el enriquecimiento de cada célula con lípidos en lugar de incrementar el número de células. Éste principio está basado en la naturaleza microalgal, que responde activamente al exceso o deficiencia de nutrientes como el nitrógeno, incluyendo las condiciones de cultivo [4].

#### 1.6.1. Medio de cultivo

A nivel laboratorio, las microalgas se cultivan en medios sintéticos que consisten en agua, compuestos inorgánicos (sales), compuestos orgánicos como el acetato y trazas metálicas [87]. Entre los medios de cultivo sintéticos empleados para el cultivo de cepas de *Coelastrum* sp. se enlistan: Chu, LC oligo, medio F, Bold Basal y TAP [30, 49, 62, 63]. Este último ha demostrado ser un medio de cultivo eficiente para el desarrollo de la especie en comparación con otros medios [88]. Sin embargo, Nanduca [87] cultivó en agua residual sintética adicionada con aguamiel de café o melaza, la especie de *Coelastrum* caracterizada mediante análisis de ultraestructura de la pared celular, análisis de secuencia ITS-2 y su estructura secundaria [49]. Las condiciones que favorecieron la adaptación de *Coelastrum* sp. fueron las siguientes: 50% (v/v) de aguamiel de café en el agua residual sintética, con un inóculo de 20%; y 1.5% (v/v) de melaza en agua residual sintética, con un inóculo de 5% [87].

#### 1.6.1.1 Agua residual como medio de cultivo para microalgas

Las microalgas pueden ser cultivadas en diversos medios minerales, sustratos orgánicos y aguas residuales sintéticas o reales que incluyen domésticas, efluentes industriales y agrícolas [89]. Las aguas residuales contienen contaminantes químicos y orgánicos, metales pesados y patógenos que las microalgas pueden remover al utilizarlos como nutrientes. Entre los nutrientes potencialmente utilizables están el nitrógeno, fosfato, minerales y metales traza, los cuales pueden ser metabolizados por las microalgas para su crecimiento y producción de biomasa microalgal, útil para la generación de combustibles. De esta manera, las microalgas desempeñan un papel importante en la fitorremediación como tratamiento terciario del agua residual, simultáneamente a la producción de biocombustibles sustentables [16, 19, 90-96], efectiva en costo [27, 92, 97].

La mezcla de agua residual de molino de aceite de oliva y agua residual urbana proveniente del tratamiento secundario, se empleó para cultivar *Scenedesmus obliquus*. La biomasa producida presentó alto contenido de carbohidratos (79.4%) en la mezcla de 50% de agua residual urbana no tratada y 5% de agua de molino; mientras que la mayor cantidad de lípidos (49.1%) se generó en la mezcla de 10% de agua residual urbana no tratada y 5% de agua fesidual urbana no tratada y 5% de agua residual urbana no tratada y 5% de agua cesidual urbana no tratada y 5% de agua residual urbana no tratada y 5% de agua residual urbana no tratada y 5% de agua residual urbana no tratada y 5% de agua cesidual urbana no tratada y 5% de agua de molino. Los lípidos producidos pueden ser transformados en

biocombustibles [93]. Por otra parte, la remoción de nutrientes mediante el cultivo de *Chlorella vulgaris* en agua residual de vivero y agua residual municipal derivó en el contenido lipídico de apenas 9.7 y 4.5 % (w/w), respectivamente; puesto que la microalga fue colectada en fase de muerte avanzada [94]. *Scenedesmus* sp. aislada de agua corriente almacenada mostró capacidad para crecer y remover eficientemente nutrientes inorgánicos del efluente secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas. En este medio produjo 0.11 gL<sup>-1</sup> (w/w) de biomasa y 31- 33% de contenido lipídico [98].

*Coelastrum* sp. cultivada en agua residual sintética con 50% (v/v) de aguamiel de café produjo 2.172 g·L<sup>-1</sup> de biomasa y un contenido lipídico de 37.74% (w/w). Con 1.5% de melaza en agua residual sintética se produjeron 2.18 g·L<sup>-1</sup> de biomasa con un contenido lipídico de 39.82% (w/w). Los resultados fueron 3 y 2 veces mayores, respectivamente, en comparación con los obtenidos en medio TAP (medio de referencia) [87].

En la tabla 1.4 se presenta la productividad de biomasa y el contenido de lípidos de cepas de microalgas de agua dulce (*B. braunii* y *C. saccharophila*), agua marina (*D. tertiolecta* y *P. carterae*) y un consorcio, aislados y cultivados en aguas residuales de la industria de la alfombra [99].

Cultivo	Medio	Biomasa (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Lípidos (%)
Potruosossus	BG11	19 ± 3	13.50 ± 3.78
bollyococcus	Tratada	37 ± 5	9.50 ± 1.24
Diduilli	No tratada	34 ± 7	13.20 ± 1.85
Chlorollo	BG11	18 ± 4	12.90 ± 1.16
Chiorella	Tratada	16 ± 3	17.00 ± 2.89
Saccharophila	No tratada	23 ± 4	18.10 ± 1.27
	BG11 modificado	31 ± 8	12.80 ± 0.64
Dunaliella tertiolecta	Tratada	38 ± 3	12.20 ± 1.41
	No tratada	28 ± 5	15.20 ± 2.43
Dia una alemuaia	BG11 modificado	28 ± 4	9.70 ± 1.26
Pleurochrysis	Tratada	37 ± 6	11.80 ± 2.10
Carlerae	No tratada	33 ± 5	12.00 ± 0.80
Consoraio	BG11	27 ± 7	10.90 ± 2.62
CONSOLCIO	Tratada	41 ± 5	12.20 ± 1.33

**Tabla 1. 4** Biomasa y producción de lípidos de microalgas aisladas de agua residual (tratada y sin tratar) de la industria de alfombras (Adaptado de S. Chinnasamy et al. [99])

	No tratada	39 ± 9	12.00 ± 2.12
--	------------	--------	--------------

Como se puede observar, *Coelastrum* sp. cultivada en agua residual sintética con aguamiel de café o con melaza puede producir contenidos lipídicos superiores a otras especies microalgales cultivadas en agua residual real y mezclas de algunos efluentes. Puesto que los resultados generados también fueron más favorables en comparación con otros medios sintéticos empleados como referencia; demuestra ser una cepa atractiva para la producción de lípidos.

#### 1.6.2 Fuente de carbono

El carbono es de especial importancia para cualquier organismo vivo puesto que es esencial para la obtención de energía para su formación y desarrollo. Dependiendo de la naturaleza orgánica o inorgánica del carbono suceden las vías metabólicas de asimilación [90]. El metabolismo autótrofo ocurre en el empleo de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) como fuente de carbono. El metabolismo heterótrofo, ocurre en la asimilación de carbono orgánico en ausencia de luz. Algunas microalgas emplean las dos fuentes de carbono orgánico e inorgánico bajo condiciones mixotróficas [90, 100-103]. Este tipo de cultivo mixotrófico es más eficiente que el fotoautótrofo o quimioheterótrofo, debido a que disminuye el tiempo del crecimiento del cultivo, incrementa la biomasa [104, 105] y la acumulación de lípidos [106].

Entre las fuentes de carbono orgánicas se encuentran la glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol (derivado de la producción de biodiesel), acetato, materiales celulósicos, azúcares (derivados de residuos industriales o agrícolas) y melaza de caña. Esta última considerada como fuente de carbono prometedora para el cultivo mixotrófico de microalgas [100, 107, 108]. En este mismo sentido, el uso de fuentes de carbono renovables y económicas se ha estimulado fuertemente [109], asimismo, la utilización de residuos y aguas residuales para cultivar microalgas podría simultáneamente contribuir a la solución de: (1) uso de agua dulce, (2) alto costo de nutrientes y (3) remediación de residuos [108].

### 1.6.2.1 Melaza de caña como fuente de carbono

La melaza de caña es un subproducto de la industria del azúcar que puede contener: 17-25% de agua, 45-50% de azúcares totales (sacarosa, glucosa y fructosa), 2-5% de polisacáridos (dextrina, pentosanos, ácidos poliurónicos) y trazas de coloides suspendidos, metales pesados, vitaminas y compuestos nitrogenados [109, 110]. En la tabla 1.5 se presentan algunas características de la melaza de caña.

Componente	Valor
Materia seca (%)	76.7
Nitrógeno (%)	0.0232
Densidad (g/L)	1360
Azúcares totales (g/Kg melaza)	836
Sacarosa (%)	51.50 ± 0.23
Glucosa (%)	9.59 ± 2.13
Fructosa (%)	4.05 ±0.08
Materia volátil (%)	86.3

Tabla 1. 5 Características de la melaza de caña (adaptado de F. Ghorbani et al. [11	1])
---	-----

Adicionalmente, la melaza utilizada en el presente estudio fue caracterizada por Nanduca [87] para determinar la cantidad de azúcares reductores, nitrógeno, fosfatos y sulfatos presentes (Tabla 1.6).

 Tabla 1. 6
 Concentración de los principales nutrientes de la melaza (tomado de H.

 Nanduca [87]).

Compuestos	Concentración
Azúcares reductores (g·L <sup>-1</sup> )	310.8
Nitrógeno (mg·L <sup>-1</sup> )	5100.0
Fosfatos (mg·L <sup>-1</sup> )	700.0
Sulfatos (mg·L <sup>-1</sup> )	1300.0

La melaza es una materia prima relativamente económica, fácilmente disponible y utilizada para la producción de diferentes metabolitos [109], que en contraste con otros subproductos agroindustriales, no requiere hidrólisis [111].

#### 1.6.3 Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de las microalgas, en las que éste representa del 7 al 20% del peso celular seco [82]. Es importante seleccionar la fuente de nitrógeno más productiva para la primera etapa de crecimiento de las microalgas [4]. El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es el principal depósito de nitrógeno en los organismos vivos, no obstante, las fuentes de nitrógeno comúnmente corresponden a nitrógeno inorgánico, principalmente en forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y amonio (NH<sub>4</sub>) los cuales son revertidas a N<sub>2</sub>. Cabe destacar que el nitrato se encuentra en un estado oxidado, siendo necesario reducirlo mediante las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, antes de su incorporación a las macromoléculas. Sin embargo, ésta reducción consume poder reductor, por lo tanto el amonio es por lo general la fuente de nitrógeno preferible para las microalgas [112]. Entre otras fuentes de nitrógeno se encuentran la urea y el extracto de levadura [4, 113-115]. El suministro de una alta concentración de nitrógeno durante la primera etapa de cultivo de la microalga (división celular) es importante para sustentar la reproducción celular [4]. Mientras que en la segunda etapa (producción de lípidos) éste es agotado para mantenimiento de la síntesis enzimática y la formación de estructuras celulares esenciales [4, 116].

Es importante señalar que la deficiencia de nutrientes, típicamente nitrógeno o silicio, mejora el contenido lipídico de las microalgas [117]. No obstante, en algunos casos la deficiencia de nitrógeno puede ocasionar una síntesis reducida de lípidos y ácidos grasos [51]. El nitrógeno es el nutriente más importante que afecta la producción de la biomasa y la productividad lipídica de varias especies de microalgas. Por ejemplo, *Scenedesmus bijugatus* metabolizó nitrato como fuente de nitrógeno, produciendo 0.32 y 0.28 g·L<sup>-1</sup> de biomasa empleando nitrato de potasio y de sodio respectivamente [118]. Por otra parte, *Scenedesmus obliquus* incrementó 43% en peso celular seco el contenido lipídico en deficiencia de nitrógeno, mientras que en condiciones de control fue de 12.7% [116]. Por tanto, la deficiencia de nitrógeno desencadena la acumulación de lípidos, particularmente
los triglicéridos [50, 51, 86, 119-124]. Asimismo, el contenido de proteínas es reducido [82, 125-127].

## HIPÓTESIS

Es posible que *Coelastrum* sp. produzca lípidos con un perfil adecuado para la producción de biocombustibles cuando es cultivada en agua residual sintética (ARS) con melaza.

## **OBJETIVOS**

### General

Determinar los cambios en el perfil lipídico de la microalga *Coelastrum sp.* cultivada en agua residual sintética (ARS) con melaza, en cultivo por lotes y bajo un modelo de cultivo en dos etapas (con adición de nutrientes sin fuente de nitrógeno al final de la fase de crecimiento exponencial) para inducir el incremento de lípidos.

## Específicos

- Cultivar la microalga *Coelastrum* sp. en agua residual sintética con melaza
- Identificar los compuestos presentes en el extracto lipídico de la microalga
   *Coelastrum* sp. cultivada en agua residual sintética con melaza

 Determinar el efecto del tipo de cultivo (por lotes y en dos etapas) en el perfil de los lípidos producidos por la microalga *Coelastrum* sp. en agua residual sintética con melaza.

# CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Estrategia experimental

Se planteó la siguiente estrategia experimental para llevar a cabo el desarrollo del presente proyecto de investigación:

Сера	Coelastrum sp. (UADY-priori-014-fmvz-05)
Medios de cultivo	Agua Residual Sintética (ARS) con melaza, TAP
1	(Tris- Acetato- Fosfato)
Cultivo de <i>Coelastrum</i> sp. en matraz Celstir	<ul> <li>Matraces Celstir de 500 mL; curvas de crecimiento, recuperación de biomasa.</li> </ul>
Cultivo de <i>Coelastrum</i> sp. en dos etapas	<ul> <li>Matraces Celstir de 500 mL; alimentación con medio sin NH<sub>4</sub>Cl, recuperación de biomasa.</li> </ul>
Extracción de los lípidos	Mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v)
Cromatografía de capa fina	<ul> <li>Cromatofolios de gel de sílice 60 F254 (MERK); fase móvil: hexano, acetato de etilo y ácido acético 9:1:0.1 (v/v)</li> </ul>
Cromatografía de columna	<ul> <li>Columna de cromatografía por gravedad con gel de sílice/columnas: face mévil: hexano acetato de stilo;</li> </ul>
	fracciones en cromatografía de capa fina
Transesterificación	<ul> <li>Metóxido de sodio 2%; Baño María</li> </ul>
Cromatografía de gases-masas	Cromatógrafo de gases-masas; columna DB5-HT (30
	m x 0.25 mm ID x 0.25 µm de espesor de película); muestras diluídas en cloroformo.
Espectroscopía FTIR	Método de reflectancia total atenuada; accesorio ATR

Figura 2. 1 Estrategia experimental

## 2.2 Material biológico

La cepa *Coelastrum* sp. (UADY-PRIORI-014-FMVZ-05) aislada en el Parque Ecológico Brisas en el Poniente de Mérida, Yucatán, fue donada por la Q.F.B Silvia J. López Adrián. La cepa pertenece a la Colección de Microalgas Marinas y de Agua dulce de la Península de Yucatán del Herbario Alfredo Barrera Marín FICOYUC-UADY (CONABIO).

## 2.3 Medios de cultivo

Se emplearon cuatro tipos diferentes de medio de cultivo, tres con agua residual sintética (ARS) y el medio Tris- Acetato- Fosfato (TAP, por sus siglas en inglés), los cuales se enlistan a continuación:

- ARS formulado según Alzate *et al.* 2007 (Anexo I), denominado en lo sucesivo ARS<sub>A</sub>, con melaza al 2% (v/v);
- ARS formulado según Pérez *et al.* 2007 modificada (Anexo I), denominado en lo sucesivo ARS<sub>P</sub>;
- 3) ARS<sub>P</sub> con melaza al 1.5% (v/v); y
- 4) TAP (Anexo II), el cual fue establecido como referencia.

El pH de los medios de cultivo se ajustó a un valor de 7.0 con HCl 1 M o KOH 1 M. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 120 °C y 1.26 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 minutos.

## 2.4 Cultivo de Coelastrum sp.

Se realizaron precultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los cultivos experimentales se llevaron a cabo por triplicado en matraces tipo Celstir de 500 mL (Figura 2.2), con una concentración celular inicial de 540,000 cel·mL<sup>-1</sup>, de acuerdo a lo determinado por Nanduca [87].



Figura 2. 2 Cultivo de Coelastrum sp. en medio TAP en reactores Celstir de 500 mL.

Los cultivos de *Coelastrum* sp. se realizaron hasta el final de la fase estacionaria (15 días) y para determinar el perfil lipídico en una fase temprana de crecimiento (producción de metabolitos primarios), se realizó el cultivo en ARS<sub>P</sub> con melaza y medio TAP acortando el periodo de cultivo a 7 y 5 días respectivamente. En la Tabla 2.1 se presenta el tiempo total de los cultivos efectuados.

Cultivo	Tiempo (días)	Clave asignada
ARS <sub>P</sub> con melaza (1.5% v/v)	7	ARS <sub>P</sub> 7
ARS <sub>P</sub> con melaza (1.5% v/v)	15	ARS <sub>P</sub> 15
TAP	5	TAP5
TAP	15	TAP15

Tabla 2. 1	Tiempo	de	incubación	de	los	cultivos
------------	--------	----	------------	----	-----	----------

Los cultivos se incubaron bajo las siguientes condiciones: temperatura de (27  $\pm$  2°C), fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad), intensidad luminosa de 30 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> proporcionada por una lámpara de luz blanca de 30 W marca Philips; y agitación de 120 rpm en una placa de agitación "Wheaton Biostir 6" [49].

#### 2.5 Conteo celular

La determinación de la concentración celular se efectuó por conteo celular para lo cual se tomó una alícuota (350µL) del cultivo microalgal en un tubo Eppendorf. La muestra se agitó con un agitador vórtex y se tomó una alícuota de 10µL para colocarla en una cámara de Neubauer. Posteriormente, mediante un microscopio óptico "Nikon Eclipse E200" con objetivo 40 X, se contabilizaron las células microalgales contenidas en los cuadrantes indicados con la letra "R" de la Figura 2.3.



Figura 2. 3 Cámara de Nuebauer

La concentración celular se calculó utilizando la siguiente fórmula [88]:

$$[cel mL^{-1}] = (total de células en 5 cuadrantes) (50,000) (dilución) (1)$$

#### 2.6 Curvas de crecimiento

Se realizaron por triplicado a partir de la toma de  $350\mu$ L de cada cultivo con los medios de cultivo previamente descritos, para determinar la concentración celular. En las curvas de crecimiento se consideró la desviación estándar de los triplicados. Asimismo, se determinó la velocidad de crecimiento celular ( $\mu$ ) en el último día de la fase exponencial, mediante la siguiente fórmula:

$$\mu = (\log_2 N_2 - \log_2 N_0) / (t_2 - t_0)$$
<sup>(2)</sup>

Dónde:

 $N_2$  = concentración celular al final de la fase exponencial  $N_1$  = concentración celular al inicio de la fase exponencial  $T_2$  = tiempo al final de la fase exponencial  $T_1$  = tiempo al inicio de la fase exponencial

#### 2.7 Cultivo en dos etapas

Se realizaron por triplicado cultivos en dos etapas para inducir un incremento en la acumulación de lípidos e identificar la influencia de este modelo de cultivo en el perfil lipídico de *Coelastrum* sp. La primera etapa consistió en realizar los cultivos por triplicado en matraces Celstir de 500 mL utilizando 500 mL de ARS<sub>P</sub> con melaza al 1.5% (v/v) —denominado ARS<sub>P</sub>-N— y 500 mL de medio TAP como referencia —denominado TAP-N—. Se inocularon 540,000 cel·mL<sup>-1</sup> a cada cultivo y se incubaron bajo las condiciones previamente descritas (apartado 2.4). Para la segunda etapa, al finalizar la fase exponencial (estimada en 5 días para ambos casos) se adicionaron 50 mL de medio fresco concentrado sin NH<sub>4</sub>Cl a los 500 mL de cultivo existentes. Los cultivos se mantuvieron hasta el día 15 y finalmente se procedió a recuperar la biomasa generada para los análisis posteriores.

### 2.8 Recuperación de la biomasa

La biomasa proveniente de los cultivos de las curvas de crecimiento y de los cultivos en dos etapas se recuperó mediante centrifugación en tubos Falcon (Figura 2.4) a 5,000 rpm, 4°C, durante 10 min en una centrífuga "Orto Alresa Digicen 21R". Se realizaron tres lavados con 5 mL de agua bidestilada estéril.



**Figura 2. 4** Biomasa húmeda recuperada por centrifugación: a) biomasa de  $ARS_P$  durante su lavado; b) triplicado de la biomasa húmeda de  $ARS_P7$ .

La biomasa húmeda, se congeló a -8°C durante 24 h. Posteriormente se deshidrató mediante liofilización al vacío en una liofilizadora "Labconco Freezone 6" por un lapso de 72 h. La biomasa seca se guardó en refrigeración a -8°C sin luz directa, para su uso posterior.

## 2.9 Extracción de lípidos totales

La extracción de los lípidos totales se efectuó mediante la técnica de lixiviación con solventes. Como primer paso se pesó la biomasa seca de cada uno de los reactores, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se disminuyó el tamaño de partícula con ayuda de una espátula metálica. Se incorporaron 30 mL de la mezcla de cloroformometanol en proporción 2:1 (v/v). Los matraces se colocaron en una agitadora marca "Zhichen ZHWY- 200B" con una agitación de 150 rpm y temperatura de 38° C, durante 3 horas. El lixiviado fue recuperado (Figura 2.5) y se evaporaron los solventes en un evaporador rotatorio "IKA<sup>®</sup> RV 10" a 40°C y 40 rpm. Finalmente, el extracto se pesó en viales previamente puestos a peso constante (Figura 2.6). Se realizaron cinco extracciones por cada muestra.



Figura 2. 5 Extracción de lípidos mediante solventes.



Figura 2. 6 Viales con extracto lipídico seco del cultivo TAP5.

## 2.10 Cromatografía de capa fina (CCF)

Para detectar la presencia de lípidos, se realizó la técnica de cromatografía de capa fina. Para ello se utilizaron cromatofolios marca MERK<sup>®</sup> de 6 x 4 cm como fase estacionaria (Figura 2.7). La fase móvil consistió en una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético (9:1:0.1 [v/v]). Las placas se revelaron con una solución de ácido fosfomolíbdico. Se emplearon como referencias aceite vegetal comestible marca Capullo y biodiesel proveniente de la transesterificación de aceite vegetal comestible marca Patrona, de fecha 26/02/2015.



Figura 2. 7 Técnica de cromatografía de capa fina.

## 2.11 Cromatografía de columna (CC)

Para la partición de los extractos lipídicos y el aislamiento de los compuestos se empleó una columna cromatográfica (Figura 2.8) de 2 cm de diámetro y 30 cm de altura; se empaquetó con gel de sílice 60 marca Fluka<sup>®</sup> Analytical de tamaño de partícula 0.063-0.2 mm, como fase estacionaria. La preparación de la cabeza de la columna se realizó con una muestra compuesta de 0.2 g del extracto lipídico de los tres reactores por cultivo disuelto en cloroformo y 3 g de gel de sílice. Posteriormente se evaporó el solvente y la cabeza se cargó en el interior de la columna. Los compuestos se eluyeron mediante la adición de las siguientes fases móviles: hexano, hexano y acetato de etilo 9:1 (v/v); hexano y acetato de etilo 8:2 (v/v); hexano y acetato de etilo 7:3 (v/v); acetato de etilo y finalmente metanol. Las fracciones se colectaron en tubos de ensayo de vidrio y la evaporación de los solventes se realizó en una campana de extracción. Las fracciones obtenidas se pesaron y se analizaron por cromatografía de capa fina.



Figura 2. 8 Separación del extracto lipídico mediante columna cromatográfica.

## 2.12 Transesterificación

Las fracciones conteniendo triglicéridos se disolvieron con 100 µL de hexano (una alícuota fue tomada para utilizarse posteriormente como referencia) y se adicionó metóxido de sodio al 2% (metanol al 40% respecto al volumen del extracto). Se sometieron a 60°C en baño María (Figura 2.9) con agitación moderada durante 1.5 h. Al término, las muestras transesterificadas se limpiaron en una columna con gel de sílice y cloroformo como fase móvil para retirar las impurezas.



Figura 2. 9 Transesterificación de la fracción con triglicéridos

## 2.13 Cromatografía de gases- masas (CGM)

La identificación de los compuestos se efectuó mediante un Cromatógrafo de gases "Agilent Technologies 7890B GC System" acoplado a un Espectrómetro de masas 5977A MSD. Se utilizó una columna DB5-HT (30 m x 0.25 mm ID x 0.25  $\mu$  de espesor de película), bajo las siguientes condiciones: flujo de gas acarreador He: 3 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; temperatura del inyector: 300°C; temperatura del horno: inicial de 70°C por 5 min, primera rampa de 10°C · min<sup>-1</sup> hasta 200°C durante 5 min, segunda rampa de 20°C · min<sup>-1</sup> hasta 290°C, manteniendo esta temperatura por 22.5 min. El volumen de inyección fue de 1  $\mu$ L. La identificación se realizó mediante comparación de los patrones de fragmentación de las muestras con los que se encuentran en la librería del equipo (NIST).

#### 2.14 Análisis de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) de los fosfolípidos

Las fracciones de fosfolípidos fueron analizadas mediante la técnica de espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier en un Espectrómetro FT-IR "Bruker, Tensor II". Las condiciones para el análisis fueron: fuente de radiación proporcionada por un diodo láser de luz infrarroja a una longitud de onda de 3-8 µm; resolución de 4 cm<sup>-1</sup> en un intervalo de longitud de onda de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>; método de Reflectancia Total Atenuada empleando un accesorio ATR con punta de diamante que funciona con fuentes de radiación NIR (rango espectral lejano), MIR (rango espectral mediano) y FIR (rango espectral cercano). Se realizaron 32 escaneos por muestra, la cual no requirió preparación previa.

#### 2.15 Análisis estadístico

Se compararon las velocidades de crecimiento y las concentraciones celulares al final de la fase exponencial en los cultivos ARS<sub>P</sub>7 y TAP5, así como de los experimentos ARS<sub>P</sub>15 y TAP15. También se compraron las concentraciones celulares al final de los cultivos ARS<sub>P</sub>15 con ARS<sub>P</sub>-N y TAP15 con TAP-N y la producción de biomasa y de lípidos de todos los cultivos. El análisis estadístico se efectuó mediante la prueba t de Student para dos muestras independientes, suponiendo varianzas iguales y desiguales, mediante el software "Origin<sup>®</sup> 9.1 Data analysis and graphing software" y utilizando un nivel de confianza de 95% y n=3.

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Crecimiento de Coelastrum sp.

En la Figura 3.1 se muestran las curvas de crecimiento de los cultivos de la microalga *Coelastrum* sp. en reactores Celstir de 500 mL en ARS<sub>P</sub> con melaza y en medio TAP. Los cultivos se mantuvieron por 15 días para conocer el comportamiento de la microalga en los dos medios.



Figura 3. 1 Curvas de crecimiento de 15 días de la microalga Coelastrum sp.

Como se puede observar, *Coelastrum* sp. presentó un crecimiento diferente en los medios de cultivo empleados. En el medio ARS<sub>P</sub> con melaza se aprecia crecimiento desde el primer día de incubación hasta el día 13, presentándose una desaceleración del crecimiento en el décimo cuarto día; no presentó una fase estacionaria definida. En el caso del medio TAP15, se observa una fase de adaptación de 1 día y crecimiento exponencial de 1 día, dando lugar posteriormente a la fase estacionaria. Este resultado

coincide con el reportado por Nanduca [87] cuya fase de adaptación dura 1 día y la estacionaria fue alcanzada el día 2 en el cultivo en medio TAP con un inóculo inicial de 5%. Las velocidades de crecimiento y la concentración celular al final de la fase exponencial en estos cultivos de *Coelastrum* sp. (Tabla 3.1) presentaron diferencia significativa (P < 0.05), ya que, aunque en el medio TAP15 la velocidad de crecimiento fue 4.8 veces mayor que en el medio ARS<sub>P</sub>15, su fase exponencial tardó sólo 1 día y se presentó una concentración celular tres veces menor. En el estudio realizado por Nanduca [87] se reportó una mayor concentración celular de *Coelastrum* sp. en ARS con melaza respecto al medio TAP, al final del experimento. Una mayor concentración celular se debe a la aportación de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, entre otros) de la melaza en el medio de cultivo [87], que si bien a la microalga le toma más tiempo para absorber, finalmente influyen tanto en el crecimiento celular como en la síntesis de metabolitos [128].

**Tabla 3. 1** Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y concentración celular al final de la fase exponencial de *Coelastrum* sp. en los cultivos ARS<sub>P</sub>15 y TAP15.

Cultivo	µ (divisiones · día⁻¹)	Días en fase exponencial	Concentración celular x 10 <sup>6</sup> (cel·mL <sup>-1</sup> )
ARS <sub>P</sub> 15	0.45 ± 0.01	13	$30.9 \pm 2.6$
TAP15	2.17 ± 0.44	1	9.7 ± 1.7

La curva de crecimiento de 15 días de *Coelastrum* sp. cultivada en ARS<sub>A</sub> con melaza se encuentra en el Anexo III. Se decidió no continuar con esta formulación de agua residual debido a que no propició un crecimiento adecuado de *Coelastrum* sp. para experimentos posteriores (Figura 3.2). Un caso similar se presentó en el cultivo con la formulación ARS<sub>P</sub> (sin melaza), donde no fue posible realizar una curva de crecimiento de 15 días, ya que el cultivo entró a la fase de muerte celular el día 6 (Figura 3.3 y Anexo IV). No obstante, la biomasa generada en ARS<sub>A</sub> y ARS<sub>P</sub> se procesó para la determinación de los perfiles lipídicos, con la finalidad de complementar la información generada en el presente trabajo.



**Figura 3. 2** Precultivo de *Coelastrum* sp. en ARS<sub>A</sub> (sin melaza). Se observa una decoloración total de las células microalgales.



**Figura 3. 3** Cultivo de *Coelastrum* sp. en  $ARS_P$  (sin melaza): a) el día de inoculación, b) el día 6. Al inicio del cultivo el medio que contiene las células de microalgas es verde, mientras que al transcurrir los días toman una coloración café.

Los periodos de cultivo de *Coelastrum* sp. se acortaron a 7 días en ARS<sub>P</sub> con melaza y 5 días en medio TAP. Estos tiempos corresponden al final de la fase de crecimiento exponencial de la especie microalgal en medio TAP, pero al presentar una fase exponencial más larga en ARS<sub>P</sub> (13 días), se decidió acortar el cultivo a 7 días para evitar la posible producción de metabolitos secundarios incluidos en el experimento a 15 días. Al final de la fase exponencial se espera una baja producción de triglicéridos puesto que son lípidos de almacenamiento [8] y una mayor formación de otros compuestos estructurales como los esteroles y fosfolípidos [7]. Las curvas de crecimiento se presentan en la Figura 3.4.



Figura 3. 4 Curvas de crecimiento de Coelastrum sp. a 5 (TAP5) y 7 días (ARS<sub>P</sub>7).

En los cultivos ARS<sub>P</sub>7 y TAP5 *Coelastrum* sp. presentó una fase de adaptación de un día. El crecimiento en el experimento TAP5 concordó con el obtenido en TAP15. Mientras que ARS<sub>P</sub>7 con melaza al presentar una fase de adaptación de 1 día, fue diferente al cultivo en ARS<sub>P</sub>15 el cual no mostró una fase de adaptación marcada. El crecimiento exponencial de *Coelastrum* sp. terminó a los 3 días de cultivo tanto en ARS<sub>P</sub>7 como en TAP5, y no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) ni en las velocidades de crecimiento, ni en las concentraciones celulares al final de la fase exponencial (Tabla 3.2). En este estudio, las concentraciones celulares obtenidas en ARS<sub>P</sub>7 y en TAP5 fueron inferiores a las reportadas por May (10.82 x 10<sup>6</sup> cel·mL<sup>-1</sup>) [129] y por Valdez *et al.* (12.0 x 10<sup>6</sup> cel·mL<sup>-1</sup>) [49], para la misma especie microalgal en medio TAP a los 4 y 5 días, respectivamente.

Cultivo $\mu$  (d<sup>-1</sup>)Días en fase<br/>exponencialConcentración celular<br/>x 10<sup>6</sup> (cel·mL<sup>-1</sup>)ARS<sub>P</sub>70.85 ± 0.0737.04 ± 0.86TAP50.90 ± 0.1138.59 ± 1.15

**Tabla 3. 2** Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y concentración celular al final de la fase exponencial de *Coelastrum* sp. en los cultivos ARS<sub>P</sub>7 y TAP5.

Como se puede observar en la Figura 3.4, en el día 5 de cultivo no hay multiplicación celular, lo que indica el inicio de la fase estacionaria de *Coelastrum* sp. Por esta razón se decidió que en los modelos de cultivo en dos etapas, la adición de medio fresco sin  $NH_4CI$ , para inducir la acumulación de lípidos (segunda etapa) se llevaría a cabo al día 5 de cultivo.

Por otra parte, la concentración celular de *Coelastrum* sp. al finalizar los cultivos de 15 días  $ARS_P15$  y  $ARS_P-N$ , así como TAP15 y TAP-N (tabla 3.3), no presentó una diferencia estadísticamente significativa (P > 0.05).

Tabla 3. 3 Concentración celular de *Coelastrum* sp. al final de la fase estacionaria (15 días)

Cultivo	Concentración celular x 10 <sup>6</sup> (cel·mL <sup>-1</sup> )	Cultivo	Concentración celular x 10 <sup>6</sup> (cel·mL <sup>-1</sup> )
ARS <sub>P</sub> 15	26.87 ± 0.97	TAP15	11.60 ± 1.67
ARS <sub>P</sub> -N	24.95 ± 2.71	TAP-N	8.47 ± 2.89

#### 3.2 Producción de biomasa y contenido lipídico

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados de la producción de biomasa en peso seco de *Coelastrum* sp. obtenida en cada ensayo experimental, la producción de lípidos y el contenido lipídico respecto a la biomasa seca. Los datos correspondientes a los cultivos ARS<sub>A</sub> y ARS<sub>P</sub> se encuentran en el Anexo V.

Cultivo	Producción de biomasa seca (g·L⁻¹)	Producción de lípidos (g·L⁻¹)	Contenido lipídico (% w/w biomasa seca)
ARS <sub>P</sub> 7	1.67 ± 0.17	$0.39 \pm 0.08$	23
ARS <sub>P</sub> 15	$2.29 \pm 0.05$	0.71 ± 0.03	31
ARS <sub>P</sub> -N	4.17 ± 0.42	0.82 ± 0.08	20
TAP5	0.67 ± 0.01	0.19 ± 0.01	28
TAP15	0.70 ± 0.03	0.23 ± 0.01	33
TAP-N	1.29 ± 0.09	0.32 ± 0.01	25

**Tabla 3. 4** Producción de biomasa seca, producción de lípidos y contenido lipídico de *Coelastrum* sp.

El cultivo de *Coelastrum* sp. realizado en ARS<sub>P</sub>7 generó 1.67  $\pm$  0.17 g·L<sup>-1</sup> de biomasa en peso seco y un extracto lipídico de 0.39  $\pm$  0.08 g·L<sup>-1</sup>, lo que representó un 23 % de lípidos con respecto a la biomasa seca. Al finalizar la fase estacionaria en este medio, en ARS<sub>P</sub>15 la producción de biomasa incrementó a 2.29  $\pm$  0.05 g·L<sup>-1</sup> y los lípidos aumentaron a 0.71  $\pm$  0.03 g·L<sup>-1</sup>, resultando un contenido lipídico del 31 %. El incremento de biomasa se debió a que *Coelastrum* sp. continuó la duplicación celular después del día 7, como se observó en la curva de crecimiento (Figura 3.1). Asimismo, el aumento del contenido lipídico microalgal fue otro factor que incrementó la producción de biomasa, ya que dependiendo de la especie microalgal, el contenido lipídico aumenta en la fase estacionaria [130] ocasionando que el tamaño celular promedio sea mayor que en la fase

exponencial [131]. Respecto al cultivo de referencia (medio TAP), la cantidad de biomasa producida no mostró una diferencia significativa (P > 0.05) entre TAP5 y TAP15 con 0.67  $\pm$  0.01 g·L<sup>-1</sup> y 0.70  $\pm$  0.03 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, la diferencia en la producción de lípidos sí fue significativa (P < 0.05) pasando de 0.19  $\pm$  0.01 g·L<sup>-1</sup> en la fase exponencial a 0.23  $\pm$  0.01 g·L<sup>-1</sup> durante la fase estacionaria, lo que representó un aumento del 28 al 33 % en el contenido lipídico. En este caso sólo incrementaron los lípidos microalgales. El aumento lipídico de *Coleastrum* sp. en ambos medios de cultivo se debe a la acumulación de lípidos de reserva en las células, principalmente TAG [132], ocasionado por el consumo de los nutrientes durante el crecimiento exponencial.

Las máximas producciones de biomasa de *Coelastrum* sp. se obtuvieron en el cultivo en dos etapas. En ARS<sub>P</sub>-N la biomasa generada fue de 4.17  $\pm$  0.42 g·L<sup>-1</sup> mientras que en el cultivo TAP-N incrementó a 1.29  $\pm$  0.09 g·L<sup>-1</sup>. Es interesante observar que, aunque la biomasa seca incrementó en comparación con los cultivos ARS<sub>P</sub>15 y TAP15, el contenido lipídico disminuyó a 20 % en ARS<sub>P</sub>-N y 25 % en TAP-N. Adicionalmente, la concentración celular de la especie microalgal al final de ambos cultivos ARS<sub>P</sub>15 y TAP15, lo cual indica que no hubo crecimiento microalgal durante la segunda etapa de los cultivos ARS<sub>P</sub>-N y TAP-N. En este sentido, el aumento de biomasa de *Coelastrum* sp. no se debió al crecimiento celular y/o el contenido lipídico, sino a la acumulación de otro tipo de metabolitos diferentes a los lípidos.

El cultivo  $ARS_P15$  presentó un mayor contenido lipídico que el cultivo  $ARS_P-N$ , por lo que no es necesario realizar un cultivo en dos etapas, según las condiciones empleadas en este estudio. Esto resulta favorecedor en un cultivo a nivel industrial con agua residual real y melaza puesto que no se requeriría un proceso adicional (suprimir el  $NH_4CI$ ) que implica un incremento en el costo de producción de los biocombustibles a producir.

## 3.3 Partición de los extractos lipídicos

Los extractos microalgales fueron particionados en fracciones menos complejas mediante las técnicas de cromatografía de columna por gravedad y de capa fina. La Figura 3.5 muestra la separación de las diferentes fracciones del extracto TAP15 que eluyeron de la columna. Los viales que contenían los mismos compuestos se unieron para generar 5 fracciones finales por extracto de cada cultivo. Estas se clasificaron de manera preliminar de acuerdo con su polaridad (menor a mayor de arriba hacia abajo en las placas cromatográficas) en: Fracción 1: hidrocarburos; Fracción 2: triglicéridos; Fracción 3: esteroles y alcoholes grasos; Fracción 4: terpenos y Fracción 5: fosfolípidos. Las fracciones secas resultantes se muestran en la Figura 3.6.



**Figura 3. 5** Placas obtenidas mediante cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas del extracto del cultivo TAP15. Cuadro rojo: hidrocarburos; cuadro amarillo: triglicéridos, cuadro verde: esteroles y alcoholes grasos, cuadro azul: terpenos y cuadro morado: fosfolípidos.



**Figura 3. 6** Cinco fracciones resultantes de la separación de los compuestos lipídicos del extracto proveniente del cultivo en TAP15.

En el caso de la fracción de TAG, esta tuvo que ser transesterificada y pasarla por gel de sílice para poder ser inyectada al cromatógrafo de gases-masas. En la Figura 3.7 el análisis por cromatografía de capa fina muestra que los TAG se transesterificaron completamente.



**Figura 3. 7** Placa cromatográfica de la fracción de triglicéridos proveniente del cultivo ARS<sub>P</sub>. Ref: fracción antes de transesterificar. A: biodiesel obtenido en el laboratorio. A2/L: fracción transesterificada.

La Figura 3.8 muestra una placa de cromatografía fina de las 5 fracciones del extracto ARS<sub>P</sub>-N. La fracción 2 (TAG) ya está transesterificada, por lo que la mancha principal (cuadro naranja) corresponde a los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) presentes en los TAG del extracto.



**Figura 3. 8** Placa de las cinco fracciones finales provenientes del extracto ARS<sub>P</sub>-N. Cuadro amarillo: triglicéridos en el extracto crudo; cuadro rojo: hidrocarburos; cuadro naranja: FAME; cuadro verde: esteroles y alcoholes grasos; cuadro azul: terpenos y cuadro morado: fosfolípidos.

En la Tabla 3.5 se presentan los valores únicos (no triplicado) del peso en mg de las cinco fracciones eluídas de cada ensayo experimental con *Coelastrum* sp., así como el peso en mg·L<sup>-1</sup> y el porcentaje respecto al extracto lipídico. El total en mg corresponde a la muestra inicial cargada a la columna cromatográfica y el total en mg·L<sup>-1</sup> es el extracto lipídico producido por el cultivo (Tabla 3.4). Nótese que la sumatoria de las cinco fracciones no concuerda con el total presentado, esto se debe a la pérdida de componentes del extracto crudo que se retienen en la columna.

Fracción	Compuesto	Peso (mg)	Peso (mg·L⁻¹)	% del extracto lipídico (w/w)
	Ex	tracto de ARS	6 <sub>P</sub> 7	
1	Hidrocarburos	5.0	8.7	2
2	Triglicéridos	25.6	44.5	11
3	Esteroles y alcoholes grasos	8.1	14.1	4
4	Terpenos	12.4	21.5	6
5	Fosfolípidos	101.4	176.2	45
	Total	225.0	391.0	
	Ext	racto de ARS	<sub>P</sub> 15	·
1	Hidrocarburos	6.0	19.3	3
2	Triglicéridos	93.2	300.5	42
3	Esteroles y alcoholes grasos	1.2	3.9	1
4	Terpenos	22.7	73.2	10
5	Fosfolípidos	46.1	148.6	21
	Total	220.5	711.0	
	Ext	tracto de ARS	<sub>Р</sub> -N	·
1	Hidrocarburos	8.1	32.6	4
2	Triglicéridos	85.1	342.2	42
3	Esteroles y alcoholes grasos	4.9	19.7	2
4	Terpenos	17.8	71.6	9
5	Fosfolípidos	60.2	242.1	30
	Total	203.6	818.7	
	E	ktracto de TAI	>5	
1	Hidrocarburos	3.8	3.5	2
2	Triglicéridos	7.6	6.9	4
3	Esteroles y alcoholes grasos	5.0	4.5	2
4	Terpenos	14.9	13.5	7
5	Fosfolípidos	95.0	86.4	46
	Total	206.8	188.0	

## Tabla 3. 5 Relación de peso y porcentaje de las fracciones

Fracción	Compuesto	Peso (mg)	Peso (mg·L⁻¹)	% del extracto lipídico (w/w)						
Extracto de TAP15										
1	Hidrocarburos	3.4	4.5	2						
2	Triglicéridos	8.5	11.3	5						
3	Esteroles y alcoholes grasos	2.3	3.1	1						
4	Terpenos	32.2	42.9	19						
5	Fosfolípidos	79.2	105.6	46						
	Total	172.6	230.1							
	Ex	tracto de TAP	P-N	·						
1	Hidrocarburos	41.9	65.8	21						
2	Triglicéridos	17.4	27.3	9						
3	Esteroles y alcoholes grasos	6.1	9.6	3						
4	Terpenos	29.7	46.6	15						
5	Fosfolípidos	92.9	145.8	46						
	Total	202.0	317.1							

En el Anexo VI se encuentran los datos de los pesos y porcentajes de las fracciones correspondiente a los extractos lipídicos de  $ARS_A$  y  $ARS_P$ .

La composición del extracto lipídico de *Coelastrum* sp. varió de acuerdo a los diferentes cultivos empleados como se muestra en la Figura 3.9.



**Figura 3. 9** Composición lipídica (valores únicos) de la microalga *Coelastrum* sp. en los diferentes cultivos: TAP de 15 días (TAP15); ARS<sub>P</sub> de 15 días (ARS<sub>P</sub>15); TAP de 5 días (TAP5); ARS<sub>P</sub> de 7 días (ARS<sub>P</sub>7); ARS<sub>P</sub> deficiente de nitrógeno (ARS<sub>P</sub>-N) y TAP deficiente de nitrógeno (TAP-N).

*Coelastrum* sp. produjo un contenido de hidrocarburos de 2 y 3 % en ARS<sub>P</sub>7 y ARS<sub>P</sub>15, respectivamente. Los TAG aumentaron considerablemente de 11 a 42% al transcurrir el tiempo del cultivo de 7 a 15 días, lo cual es de esperarse debido a la acumulación de lípidos de almacenamiento en la fase estacionaria del cultivo. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura en cuanto al contenido de TAG en microalgas referidas como oleaginosas, bajo condiciones favorables de crecimiento (20 - 50 %) [51, 58], por lo cual *Coelastrum* sp puede ser considerada una especie oleaginosa. La disminución de los esteroles de 4 a 1 % al transcurrir el cultivo de 7 a 15 días puede atribuirse al cambio en el metabolismo de las microalgas, ya que los esteroles son compuestos estructurales de las membranas celulares [7], por lo tanto, son sintetizados mayormente durante la duplicación celular. Mientras que los terpenos son metabolitos secundarios producidos después del crecimiento logarítmico [9, 13], mismos que aumentaron de 6 a 10 % al pasar de la fase exponencial (ARS<sub>P</sub>7) al final de la fase estacionaria (ARS<sub>P</sub>15). Por otra parte, los fosfolípidos disminuyeron de 45 a 21 %, lo cual se debe a que son lípidos estructurales

[8] producidos también durante la fase de duplicación celular. El cultivo en dos etapas no produjo grandes cambios del contenido de hidrocarburos (4 %), triglicéridos (42 %), esteroles y alcoholes grasos (2 %) y terpenos (9 %) en ARS<sub>P</sub>-N en comparación con ARS<sub>P</sub>15. El porcentaje de fosfolípidos presentó un incremento más notorio (de 21 a 30 %) lo cual se atribuye al aumento de tamaño celular de *Coelastrum* sp. y no a la duplicación celular, como se comentó en el apartado 3.2.

En el medio TAP, el tiempo de cultivo de 5 a 15 días no afectó al contenido de hidrocarburos y esteroles. En cuanto a los TAG, compuestos utilizados en la producción de biodiesel y bioturbosina, aunque la producción aumentó de 6.9 a 11.3 mg·L<sup>-1</sup>, sólo representó un incremento de 4 a 5%. Los fosfolípidos permanecieron en 46 % en TAP5 y TAP15 debido a que la duplicación celular se detuvo y la producción de biomasa se mantuvo constante. Aunque el contenido lipídico incrementó (tabla 3.4), esta variación se debe a la acumulación de lípidos de almacenamiento y no de los estructurales. Sin embargo, en el caso del medio TAP se promovió el almacenamiento de terpenos de manera preferencial a los triglicéridos, mismos que incrementaron de 7 a 19 %, siendo este el aumento más notorio de TAP5 a TAP15. El cultivo en dos etapas en el caso del medio TAP sí provocó cambios notorios. El incremento más notable se presentó en los hidrocarburos al pasar de 2 % en TAP15 a 21 % en TAP-N. Es decir, el cultivo en dos etapas con medio TAP promovió la producción de hidrocarburos como lípidos de almacenamiento de Coelastrum sp., en comparación con los TAG de los experimentos en agua residual sintética con melaza y los terpenos del cultivo en TAP15. Asimismo, esta producción de hidrocarburos de Coelastrum sp. concuerda con el 21 % reportado para Scenedesmus sp. [7]. Los TAG incrementaron de 5 a 9 % en contraste con los terpenos que disminuyeron de 19 a 15 % en TAP-N. Los lípidos estructurales (esteroles y fosfolípidos) no presentaron cambios notables, ya que no aumentó el crecimiento celular (tabla 3.3) y no aportaron un incremento importante en la producción de biomasa y contenido lipídico.

El extracto lipídico proveniente del cultivo ARS<sub>P</sub>15 presentó una mejor composición para producir biocombustibles, en comparación con los medios TAP, debido al mayor contenido de TAG. El extracto lipídico de ARS<sub>P</sub>15 presentó menor contenido de

52

fosfolípidos, comparado con TAP 15, estos compuestos complican los procesos de transesterificación, hidrotratamiento, reducción y combustión [41, 47].

#### 3.4 Análisis del perfil lipídico

Se identificaron los compuestos presentes en las primeras 4 fracciones obtenidas de cada cultivo mediante cromatografía de gases-masas. Los cromatogramas obtenidos se encuentran en el Anexo VII. Los compuestos reportados corresponden a los que mostraron una similitud con el patrón de fragmentación igual o superior a 90%, así como un área de pico mayor a 4% del total de áreas de todos los picos presentes en la muestra. La Figura 3.10 muestra el cromatograma obtenido de la fracción de hidrocarburos de ARS<sub>P</sub>15.



**Figura 3. 10** Cromatograma correspondiente a la fracción de hidrocarburos del cultivo en ARS<sub>P</sub>15. 31: ciclotetracosano; 53: acetato de triacontilo; 34: 1-heptacoseno; 24: Escualeno.

Los compuestos identificados (Tabla 3.6) fueron 61 en total y se encontraron distribuidos entre los ocho diferentes lotes de muestras (incluyendo los cultivos  $ARS_A$  y  $ARS_P$ ). El medio de cultivo (agua residual sintética y el medio TAP), la fase de crecimiento y el

modelo de cultivo en dos etapas propiciaron la variación en la composición lipídica. No obstante, cabe resaltar que se encuentran compuestos en común, como se explica en la siguiente sección.

	Compuesto	Área del pico (% del total de cada cultivo)							
Pico	Nombre	ARS <sub>P</sub>	ARS <sub>A</sub>	ARS <sub>P</sub> 7	TAP15	TAP5	ARS <sub>P</sub> 15	ARS <sub>P-</sub> N	TAP-N
1	1,13-Tetradecadieno	0.1							
2	14-Hexadecenal	0.1							
3	1-Octadeceno	0.1				2.6			
4	Octadecano	0.3	1.1	0.6	0.7				
5	Eicosano	0.2	1.1	0.8					
6	Heneicosano	0.1		0.5					
7	Hexacosano	0.2				1.7			
8	Tetracosano	0.1							
9	Éster metílico del ácido 7,10- Hexadecadienoico	4.2			3.8		3.0	4.0	
10	Éster metílico del ácido (Z)-9- Hexadecenoico	9.7	22.2	4.8			4.2	10.8	
11	Éster metílico del ácido hexadecanoico	24.3	16.2	16.0	4.6		15.3	37.3	14.3
12	Éster metílico del ácido (Z)-9- Octadecenoico	37.0							43.4
13	Éster metílico del ácido octadecanoico	13.6	6.9	3.7			4.3	13.1	3.8
14	Éster metílico del ácido octacosanoico	7.2		8.7				6.3	
15	2-Decenal	0.6							
16	Éster 2-metil-, 3-hidroxi- 2,2,4-trimetilpentilico del ácido propanoico	0.3				3.0			
17	Hexadeceno	0.1							

 Tabla 3. 6 Composición lipídica de Coelastrum sp.

18	Latosterol	0.3							
19	7,16-Estigmastadien-3-ol, (3- $\beta$ , 5- $\alpha$ )	1.5		5.7					
20	Glicerina	0.1							
21	Éster bis (2-etilhexil) del ácido hexanedioico	0.1	20.7		5.3				
22	Neofitadieno		3.8	0.03	18.5	2.2	0.2	0.7	2.4
23	Nonadeceno		5.1	0.1				0.2	3.6
24	Escualeno		1.3	0.6			5.0	2.6	
25	Éster metílico del ácido (Z)-7- Hexadecenoico		4.0						3.3
26	Éster metílico del ácido (E)10, (Z)12- octadecadienoico		6.4						
27	Éster metílico de ácido pentacosanoico		4.6						
28	6,10,14-Trimetil-2- Pentadecanona		2.2			1.8			
29	Ácido n-Hexadecanoico		3.2		1.5	1.9			
30	Ácido octadecanoico		0.4						
31	Ciclotetracosano		0.7				4.4		4.7
32	Nonadecano			0.5					
33	2-butoxi fosfato (3:1) etanol			0.7					
34	1-Heptacoseno			5.3			6.4	2.8	1.0
35	Éster metílico del ácido (E)- 9-octadecenoico			52	19.7				
36	2,3,5 trimetil decano				0.7				
37	Heptadecano				1.6	3.5			

38	1-Docoseno	6.7	36.6			
39	17-Pentatriaconteno	1.4				
40	Éster metílico del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	3.7				
41	Éster metílico del ácido (Z)-9- (Z)-12-Octadecadienoico	3.5		13.7	18.5	12.4
42	Éster metílico del ácido 9,12- octadecadienoico	15.8				
43	1-Hexadecanol	0.4				
44	1-Heptadecanol	0.5				
45	Fitol	5.1			0.1	2.9
46	Citrato de butilo	2.1				
47	1-Docosanol	0.7				
48	Éster butílico del ácido butanoico	0.9				
49	7-Ergosten-3-β-ol	2.9				
50	1-Hexacoseno		5.0			
51	Éster metílico del ácido (E)- 9, (Z)-11- octadecadienoico		3.1			
52	Éster metílico del ácido (E)- 13-octadecenoico		5.7			
53	Acetato de triacontilo		6.3	2.9	1.4	
54	Ciclotriacontano		1.9			
55	7-Ergosten-3-ol		4.7			
56	Condrilasterol		19.9			
57	Éster metílico del ácido-7- octadecenoico			40.7		

58	Acetato de heptacosilo							1.9	
59	1-Nonacoseno							0.3	5.4
60	Ciclododecano								1.9
61	Ciclotetradecano								1.0
	Área total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

#### 3.4.1 Perfil lipídico de Coelastrum sp. en ARS (agua residual sintética) con melaza

En medio ARS<sub>P</sub> con melaza, predominaron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME): C16 y C18 saturados y monoinsaturados, mismos que representaron el 76.5 y 64.5 % del área de los picos en los cultivos ARS<sub>P</sub>7 y ARS<sub>P</sub>15, respectivamente. Estos FAME predominaron también en microalgas verdes pertenecientes a los géneros *Scenedesmus, Desmodesmus y Coelastrum* [49], *Coelastrum* sp. [49, 63], *Coelastrum microporum* [62], *Coelastrum asteroidum* [61, 69], así como en las especies *Chlorococcum* sp., *Chlorella* sp., *Ankistrodesmus* sp. [69] y *Scenedesmus obliquus* [93], por mencionar algunas. En menor porcentaje se identificaron compuestos C16:2, C18:2 y C28:0. En ARS<sub>P</sub>7 predominaron los FAME: éster metílico del ácido (E)-9-octadecenoico (C18:1) y el éster metílico del ácido 7-octadecenoico (C16:0). Por otra parte, en ARS<sub>P</sub>15 destacaron: éster metílico del ácido 7-octadecenoico (C18:1), éster metílico del ácido hexadecanoico (C16:0) y éster metílico del ácido (Z)-9-(Z)-12-octadecadienoico (C18:2).

Los hidrocarburos fueron los compuestos más abundantes después de los triglicéridos. Su contenido incrementó de 9.1 a 18.7 % conforme al tiempo de cultivo en ARS<sub>P</sub>7 (7 días) y ARS<sub>P</sub>15 (15 días), respectivamente. Los hidrocarburos identificados fueron C18 a C32, siendo el 1-heptacoseno ( $C_{27}H_{54}$ ) y escualeno ( $C_{30}H_{50}$ ) los presentes en ambos ensayos; mientras que el eicosano ( $C_{20}H_{42}$ ) se identificó en ARS<sub>P</sub>7 y el ciclotetracosano ( $C_{24}H_{48}$ ) en ARS<sub>P</sub>15. Este resultado obtenido difiere de lo reportado para *Coelastrum asteroidum*, donde predominaron alcanos de cadena C16 (hexadecano) a C20 (eicosano) [69]. Cabe mencionar que el escualeno ha sido identificado en otras especies microalgales como *Chlorella vulgaris, Scenedesmus* sp. y *Schizochytriun limacinum* [7]. En menor porcentaje se identificó en ARS<sub>P</sub>15 el terpeno neofitadieno, que si bien se encuentra en casi todos los cultivos (con excepción de ARS<sub>P</sub>), incrementó de < 0.1 a 0.2 %.

#### 3.4.2 Perfil lipídico de Coelastrum sp. en medio TAP

En el medio TAP fueron identificados diferentes compuestos en función al tiempo del cultivo. En TAP5 predominaron los hidrocarburos con 57.6 % y en TAP15 los FAME con 56.4 % de área de los picos. Los hidrocarburos identificados en los extractos de TAP5 y

TAP15 fueron de cadena de C17 hasta C36. En TAP5 se identificó principalmente 1-Docoseno, mientras que en TAP15 su presencia disminuyó de 36.6 a 6.7 %. Los FAME identificados fueron C16 a C22 saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, siendo estos últimos los más abundantes en TAP15 (32.1 %), en contraste con el 3.1 % en TAP5. En TAP5 se identificó principalmente éster metílico del ácido (E)-13 octadecenoico (C18:1) y en TAP15 éster metílico del ácido (E)-9-octadecenoico (C18:1) y éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2).

En TAP5 se identificaron esteroles como el condrilasterol con 19.9 % de área. Este compuesto se ha reportado en las microalgas *Scenedesmus* sp., *C. reinhardtii* y *Schizochytriun limacinum* [7]. Asimismo, el ergosta-7-en 3-ol representó el 4.7 % y el terpeno neofitadieno 2.2 %. En TAP15 los esteroles disminuyeron de 24.6 a 8.0 % del área de los picos, predominando el fitol con 5.1 %. El terpeno neofitadieno incrementó hasta 18.5 % en TAP15. El fitol ha sido reportado anteriormente como componente de la materia insaponificable de las especies de microalgas *Chlamydomonas reinhardt*ii, *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis* sp. y *Scenedesmus* sp. [7].

#### 3.4.3 Efecto del cultivo en dos etapas en el perfil lipídico

#### 3.4.3.1 Agua residual sintética con melaza

Los compuestos identificados en el extracto lipídico del cultivo ARS<sub>P</sub>-N, fueron los encontrados en el ARS<sub>P</sub>7 y ARS<sub>P</sub>15, pero con variación en su concentración, además de otros compuestos adicionales. Estas variaciones en el perfil lipídico se deben al cambio de las condiciones ambientales cuando se pasa de un cultivo por lotes a un cultivo en dos etapas, y que pueden influir en el metabolismo de *Coelastrum* sp. y su composición celular [82].

Respecto a los FAME, al igual que en  $ARS_P7$  y  $ARS_P15$ , predominaron los compuestos C16 y C18 saturados y monoinsaturados, los cuales en  $ARS_P-N$  representaron el 61.2 % de los metabolitos totales. Los principales FAME identificados fueron: éster metílico del ácido hexadecanoico (C16:0), cuyo porcentaje fue duplicado en  $ARS_P-N$  respecto a
$ARS_P7$  y  $ARS_P15$ ; además de éster metílico del ácido (Z)-9, (Z)-12-octadecadienoico (C18:2), éster metílico del ácido octadecanoico (C18:0) y éster metílico del ácido (Z)-9hexadecenoico (C16:1). Los hidrocarburos procedentes de  $ARS_P-N$  disminuyeron respecto a los de  $ARS_P15$ . Estos constituyeron el 9.2 %, e incluyeron cadenas de C19 a C32, destacando el 1-heptacoseno y el escualeno. Cabe mencionar la aparición del esterol denominado fitol en la tercera fracción, aunque representó apenas el 0.1 % del área. Finalmente, el terpeno neofitadieno incrementó a 0.7 % respecto al encontrado en el medio  $ARS_P15$ .

#### 3.4.3.2 Medio TAP

Como en el caso del cultivo TAP15, la composición lipídica de TAP-N se vio principalmente constituida por triglicéridos. Sin embargo, en TAP-N incrementó notablemente el contenido de C16 y C18 saturados y monoinsaturados, pasando de 24.3 % de TAP15 a 64.8 %. Los FAME predominantes fueron: éster metílico del ácido (Z)- 9- octadecenoico (C18:1), éster metílico del ácido hexadecanoico (C16:0) y éster metílico del ácido (Z)-9, (Z)-12-octadecadienoico (C18:2). Los hidrocarburos identificados constituyeron un 17.6 % de los lípidos e incluyeron compuestos cíclicos de C12, C14 y C24, así como alifáticos de cadenas C19 a C29; destacan 1-Nonacoseno, ciclotetracosano y 1-Nonadeceno. De los compuestos minoritarios identificados, el esterol fitol disminuyó su contenido de 5.1 % en TAP15 a 2.9 % en TAP-N, mientras que el terpeno neofitadieno redujo de 18.5 % en TAP15 a 2.4 % en TAP-N.

Los compuestos identificados en el perfil lipídico de *Coelastrum* sp. fueron primordialmente ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), provenientes de la transesterificación de los triglicéridos. En su mayoría fueron C16 y C18 monoinsaturados y saturados, y una menor proporción de poliinsaturados, por lo cual son adecuados para ser empleados como biodiesel [65]. Asimismo, se pueden producir otros biocombustibles a partir de los hidrocarburos (diésel verde) [69, 133] y esteroles [42] mediante un proceso adecuado como el craqueo catalítico [41]. Aunque los diferentes cultivos realizados en la presente investigación generaron este tipo de compuestos en diferentes proporciones, se requeriría un análisis más profundo en cuanto al rendimiento de la composición lipídica y posiblemente también desde el punto de vista económico.

#### 3.5 Espectroscopía FTIR de los fosfolípidos

Los análisis de espectroscopía FTIR se realizaron a las fracciones más polares de cada ensayo experimental, de acuerdo al resultado obtenido por cromatografía de capa fina. Como se puede apreciar en la Figura 3.11, las muestras presentaron espectros similares.



**Figura 3. 11** Espectros ATR-FTIR de las fracciones de fosfolípidos en los medios  $ARS_P$ ,  $ARS_P7$ , TAP15, TAP5,  $ARS_P15$ ,  $ARS_P-N$ , TAP-N y  $ARS_A$ .

Se identificaron señales intensas en la región de 1035 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento simétrico del éster P-O-C. Las señales a 1095 y 1240 cm<sup>-1</sup> son asociadas al estiramiento simétrico/asimétrico del diéster  $PO_2^-$ , lo cual corresponde a los grupos fosfato de la fracción más polar [134]. Asimismo, se detectaron bandas en las regiones 1458,

1715 y 2852 a 2915 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a los grupos CH<sub>2</sub>, C=O y C-H, respectivamente. Estos grupos pueden estar presentes en otros compuestos como los triglicéridos (debido a la fracción glicerol), sin embargo, los grupos funcionales fosfato son característicos de los fosfolípidos [134]. El análisis FTIR se realizó únicamente para detectar la presencia de los fosfolípidos y no se efectuó una identificación ni cuantificación de los mismos. Es importante señalar que a la fecha no se ha registrado la identificación de fosfolípidos en *Coelastrum* sp. Aunque en extractos de *Scencedesmus* sp. se han identificado fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilcolina (PC) en el cultivo a cielo abierto [7], lo cual difiere de las condiciones empleadas en el presente estudio. Sin embargo, esos fosfolípidos concuerdan con los principales reportados para las microalgas. Por lo anterior y dada la relación filogenética de *Coelastrum* sp. con *Scenedesmus* sp., los fosfolípidos mencionados podrían formar parte del extracto lipídico de la especie microalgal objeto de estudio.

### CONCLUSIONES

- La microalga *Coelastrum* sp. presentó un mayor crecimiento empleando como medio de cultivo el Agua Residual Sintética (ARS) con melaza (1.5 % v/v), lo cual se vio reflejado en una mayor concentración celular y producción de biomasa en peso seco, en comparación con el medio TAP.
- El ARS con melaza (1.5 % v/v) propició una mayor producción de biomasa en peso seco y contenido lipídico en el cultivo de *Coelastrum* sp. durante 15 días, en comparación con el cultivo de 7 días. El cultivo en medio TAP también favoreció el aumento del contenido lipídico, pero no superó el generado en el ARS con melaza a 15 días.
- En el cultivo de *Coelastrum* sp., el medio ARS con melaza (1.5 % v/v) propició la acumulación de un mayor contenido de triglicéridos, mientras que el medio TAP favoreció la presencia de terpenos pero también de fosfolípidos.
- El cultivo en dos etapas realizado no dio los resultados esperados en cuanto al incremento del contenido lipídico. En ARS con melaza (1.5 % v/v) incrementó la producción de biomasa pero no el contenido lipídico y no se observaron cambios en el perfil de lípidos. En el medio TAP propició el aumento de la producción de biomasa seca y variación favorable en el perfil lipídico, pero disminuyó el contenido de lípidos.
- En el perfil lipídico de *Coelastrum* sp. se identificaron principalmente los FAME C16 y C18 saturados y monoinsaturados, en todos los ensayos experimentales de ARS con melaza, y un bajo contenido de compuestos poliinsaturados; por lo cual el extracto es adecuado para su empleo como materia prima para biocombustibles, específicamente el biodiesel. El medio TAP favoreció el incremento de FAME monoinsaturados y poliinsaturados; los cuales reducen la calidad de los extractos para su uso como materia prima para la producción de biocombustibles.
- El cultivo de *Coelastrum* sp. en ARS con melaza (1.5 % v/v) durante 15 días, propició la producción de biomasa (en peso seco) con un alto contenido de lípidos y un perfil lipídico adecuado para su empleo como materia prima para la producción de biocombustibles como el biodiesel.

### PERSPECTIVAS

Si bien *Coelastrum* sp. mostró capacidad para crecer en el ARS y producir lípidos con un perfil adecuado para su uso como biocombustibles, es necesario realizar estudios para analizar su crecimiento en agua residual real y determinar su perfil lipídico.

Se demostró que incrementar el tiempo de cultivo de *Coelastrum* sp. en ARS con melaza aumenta su producción de biomasa y contenido lipídico, por lo que sería importante determinar el tiempo de cultivo óptimo para la producción de lípidos en este medio.

Es necesario establecer las condiciones del cultivo en dos etapas y/o limitación de nitrógeno para generar un incremento del contenido lipídico de *Coelastrum* sp.

Conociendo el perfil de lípidos producidos por *Coelastrum* sp., un avance deseable sería proponer un sistema de reacciones mediante el cual se logre la síntesis de un biocombustible que permita el mejor aprovechamiento del extracto lipídico de esta especie microalgal.

Estudiar la producción de lípidos utilizando ARS en el cultivo de otras especies de microalgas.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Ghasemi Y., Rasoul-Amini S., Naseri A. T., Montazeri-Najafabady N., Mobasher M.
  A., y Dabbagh F., Microalgae biofuel potentials (Review), *Applied Biochemistry and Microbiology 48*, 126-144, 2012.
- [2] Bezergianni S. y Dimitriadis A., Comparison between different types of renewable diesel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews 21*, 110-116, 2013.
- [3] Sunphorka S., Prapaiwatcharapan K., Hinchiranan N., Kangvansaichol K., y Kuchonthara P., Biocrude oil production and nutrient recovery from algae by twostep hydrothermal liquefaction using a semi-continuous reactor, *Korean Journal of Chemical Engineering* 32, 79-87, 2015.
- [4] Suali E. y Sarbatly R., Conversion of microalgae to biofuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews 16*, 4316, 2012.
- [5] Neenan B., Feinberg, D., Hill, A., McIntosh, R., y Terry, K., Fuels from microalgae: technology status, potential, and research requirements, *Solar Energy Research Institute*, Colorado, 1986.
- [6] Tracy N. I., Crunkleton D. W., y Price G. L., Gasoline production from phytol, *Fuel 89*, 3493-3497, 2010.
- [7] Yao L. X., Gerde J. A., Lee S. L., Wang T., y Harrata K. A., Microalgae lipid characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 1773-1787, 2015.
- [8] Borowitzka M. A. y Moheimani N. R., *Algae for Biofuels and Energy*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, 17-36.
- [9] Nugroho L. H. y Verpoorte R., Secondary metabolism in tobacco, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68*, 105-125, 2002.
- Barberel S. I. y Walker J. R., The effect of aeration upon the secondary metabolism of microorganisms, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *17*, 281, 2000.
- [11] Garcia D. E., Los metabolitos secundarios de las especies vegetales, *Pastos y Forrajes* 27, 1-12, 2004.
- [12] Brakhage A. A., Regulation of fungal secondary metabolism, *Nature Reviews Microbiology 11*, 21-32, 2013.
- [13] Frassanito R., Cantonati M., Tardìo M., Mancini I., y Guella G., On-line identification of secondary metabolites in freshwater microalgae and cyanobacteria

by combined liquid chromatography–photodiode array detection-mass spectrometric techniques, *Journal of Chromatography A, 1082*, 33-42, 2005.

- [14] Richmond A., Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. John Wiley & Sons, 2008, 3.
- [15] Dos Santos R. R., Moreira D. M., Kunigami C. N., Aranda D. A. G., y Teixeira C. M.
  L. L., Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass, *Ultrasonics Sonochemistry 22*, 5-99, 2015.
- [16] Brennan L. y Owende P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable* and Sustainable Energy Reviews 14, 557-577, 2010.
- [17] Amaro H. M., Macedo Â. C., y Malcata F. X., Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels?, *Energy* 44, 58-166, 2012.
- [18] Cuellar-Bermudez S. P., Aguilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D. L., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa M. A., y Parra-Saldivar R., Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins, *Microbial Biotechnology* 8, 190-209, 2015.
- [19] Mostafa S. S. M., Shalaby E. A., y Mahmoud G. I., Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production, *Notulae Scientia Biologicae 4*, 56-65, 2012.
- [20] Mata T. M., Martins A. A., y Caetano N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews 14*, 217-232, 2010.
- [21] Stengel D. B., Connan S., y Popper Z. A., Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application, *Biotechnology Advances 29*, 483-501, 2011.
- [22] Mendes R. L., Nobre B. P., Cardoso M. T., Pereira A. P., y Palavra A. F., Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, *Inorganica Chimica Acta 356*, 328-334, 2003.
- [23] Batista A. P., Gouveia L., Bandarra N. M., Franco J. M., y Raymundo A., Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products, *Algal Research 2*, 164-173, 2013.

- [24] Guermazi W., Masmoudi S., Boukhris S., Ayadi H., y Morant-Manceau A., Under low irradiation, the light regime modifies growth and metabolite production in various species of microalgae, *Journal of Applied Phycology 26*, 2283-2293, 2014.
- [25] Chisti Y., Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25, 294-306, 2007.
- [26] Rocha J. M. S., Garcia J. E. C., y Henriques M. H. F., Growth aspects of the marine microalga Nannochloropsis gaditana, Biomolecular Engineering 20, 237-242, 2003.
- [27] Damiani M. C. *et al.*, Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in Scenedesmus acutus PVUW12, *Journal of Applied Phycology* 26, 1423-1430, 2014.
- [28] Safarov I., Abdullaev A., Khujamshukurov N., y Shakirov Z., Influence of temperature and CO<sub>2</sub> on the growth and accumulation oil of microalgae, *British Journal of Applied Science & Technology 10*, 1-9, 2015.
- [29] Ahmad A. L., Yasin N. H. M., Derek C. J. C., y Lim J. K., Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews 15*, 584-593, 2011.
- [30] Minillo A., Godoy H. C., y Fonseca G. G., Growth performance of microalgae exposed to CO2, *Journal of Clean Energy Technologies 1*, 110-114, 2013.
- [31] Do Nascimento M., Ortiz-Marquez J. C. F., Sanchez-Rizza L., Echarte M. M., y Curatti L., Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South-Eastern Buenos Aires, Argentina, *Bioresource Technology* 125, 283-290, 2012.
- [32] Garciano L. O., Tran N. H., Kannangara G. S. K., Milev A. S., Wilson M. A., y Volk H., Developing saponite supported cobalt-molybdenum catalysts for upgrading squalene, a hydrocarbon from the microalgae *Botryococcus braunii*, *Chemical engineering science 107*, 302-310, 2014.
- [33] Yu G., Zhang Y., Guo B., Funk T., y Schideman L., Nutrient Flows and Quality of Bio-crude Oil Produced via Catalytic Hydrothermal Liquefaction of Low-Lipid Microalgae, *BioEnergy Research* 7, 1317-1328, 2014.
- [34] Fu J., Yang C., Wu J., Zhuang J., Hou Z., y Lu X., Direct production of aviation fuels from microalgae lipids in water, *Fuel 139*, 678-683, 2015.

- [35] Krohn B. J., McNeff C. V., Yan B., y Nowlan D., Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan® process, *Bioresource Technology 102*, 94-100, 2011.
- [36] Dillschneider R., Steinweg C., Rosello-Sastre R., y Posten C., Biofuels from microalgae: Photoconversion efficiency during lipid accumulation, *Bioresource Technology* 142, 647-654, 2013.
- [37] Herrera-Valencia V. A., Us-Vázquez R. A., Larqué-Saavedra F. A., y Barahona-Pérez L. F., Naturally occurring fatty acid methyl esters and ethyl esters in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Annals of microbiology* 62, 865-870, 2012.
- [38] Demirbas A., *Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines*. London: Springer Verlag, 2008, 121.
- [39] Um B.-H. y Kim Y.-S., Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry 15*, 1-7, 2009.
- [40] Demirbas A. y Fatih Demirbas M., Importance of algae oil as a source of biodiesel, *Energy Conversion and Management 52*, 163-170, 2011.
- [41] Wagner J. L., Ting V. P., y Chuck C. J., Catalytic cracking of sterol-rich yeast lipid, *Fuel 130*, 315-323, 2014.
- [42] Bohlmann J. y Keeling C. I., Terpenoid biomaterials, *The Plant Journal : for cell and molecular biology 54*, 656-669, 2008.
- [43] Olofsson M., Lamela T., Nilsson E., Bergé J. P., Del Pino V., Uronen P., y Legrand,
  C., Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis* oculata grown in outdoor large-scale photobioreactors, *Energies* 5, 1577-1592, 2012.
- [44] Harwood J. L., Harwood J. L., y Gurr M. I., *Lipid Biochemistry: An Introduction*. Boston, MA: Springer US, 1991, 4-9.
- [45] Sukenik A., Yamaguchi Y., y Livne A., Alterations in lipid molecular species of the marine Eustigmatophyte *Nannochlorosis sp.* 1., *Journal of Phycology 29*, 620-626, 1993.
- [46] Li-Beisson Y., Beisson F., y Riekhof W., Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii, The Plant Journal 82*, 504-522, 2015.

- [47] Iyer R., The issue of reducing or removing phospholipids from total lipids of a microalgae and an oleaginous fungus for preparing biodiesel, *Biofuels* 7, 37-72, 2016.
- [48] Foley P. M., Beach E. S., y Zimmerman J. B., Algae as a source of renewable chemicals: Opportunities and challenges, *Green Chemistry 13*, 1399-1405, 2011.
- [49] Valdez-Ojeda R. *et al.*, Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production, *Algal Research* 7, 33-44, 2015.
- [50] Thompson G. A., Lipids and membrane function in green algae, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1302*, 17-45, 1996.
- [51] Hu Q. *et al.*, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *The Plant Journal 54*, 621-639, 2008.
- [52] Siegenthaler P. A. y Murata N., *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers 1998, 53-62.
- [53] Hölzl G. y Dörmann P., Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria, *Progress in Lipid Research 46*, 225-243, 2007.
- [54] Dembitsky V. M., Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology, *Progress in Lipid Research 35*, 1-51, 1996.
- [55] Eichenberger W., Araki S., y Müller D. G., Betaine lipids and phospholipids in brown algae, *Phytochemistry 34*, 1323-1333, 1993.
- [56] Kato M., Sakai M., Adachi K., Ikemoto H., y Sano H., Distribution of betaine lipids in marine algae, *Phytochemistry* 42, 1341-1345, 1996.
- [57] Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Vonshak A., y Cohen Z., Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid, *Phytochemistry* 60, 497-503, 2002.
- [58] Klok A. J., Lamers P. P., Martens D. E., Aisma R. B., y Wijffels R. H., Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation, *Trends in Biotechnology* 32, 521-528, 2014.
- [59] Knothe G., Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters, *Fuel Processing Technology 86*, 1059-1070, 2005.
- [60] Islam M. A., Magnusson M., Brown R. J., Ayoko G. A., Nabi M. N., y Heimann K., Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles, *Energies 6*, 5676-5702, 2013.

- [61] Vidyashankar S., Deviprasad K., Chauhan V. S., Ravishankar G. A., y Sarada R., Selection and evaluation of CO<sub>2</sub> tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions, *Bioresource Technology* 144, 28-37, 2013.
- [62] Nascimento I. A. *et al.*, Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria, *BioEnergy Research* 6, 1-13, 2013.
- [63] Liu Z. *et al.*, Isolation and characterization of a marine microalga for biofuel production with astaxanthin as a co-product, *Energies 6*, 2759-2772, 2013.
- [64] Paik M.-J., Kim H., Lee J., Brand J., y Kim K.-R., Separation of triacylglycerols and free fatty acids in microalgal lipids by solid-phase extraction for separate fatty acid profiling analysis by gas chromatography, *Journal of Chromatography A 1216*, 5917-5923, 2009.
- [65] Hoekman S. K., Broch A., Robbins C., Ceniceros E., y Natarajan M., Review of biodiesel composition, properties, and specifications, *Renewable and Sustainable Energy Reviews 16*, 143-169, 2012.
- [66] Metzger P., Allard B., Casadevall E., Berkaloff C., y Coute A., Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus-braunii* (Chlorophyceae) that produces lycopaiene, a tetraterpenoid hydrocarbon, *Journal of Phycology 26,* 258-266, 1990.
- [67] Hirose M., Mukaida F., Okada S., y Noguchi T., Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga *Botryococcus braunii* (race A), *Eukaryotic Cell 12*, 1132-1141, 2013.
- [68] Okada S., Murakami M., y Yamaguchi K., Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii*, *Journal of Applied Phycology* 7, 555-559, 1995.
- [69] Vidyashankar S. *et al.*, Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source, *Biomass and Bioenergy* 77, 75-91, 2015.
- [70] Lohr M., Schwender J., y Polle J. E. W., Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae, *Plant Science 185–186*, 9-22, 2012.
- [71] Bach T. J. y Rohmer M., *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches*. New York, NY: Springer-Verlag, 2013, 2.

- [72] Kawasaki T. *et al.*, Biosynthesis of a Natural Polyketide-Isoprenoid Hybrid Compound, Furaquinocin A: Identification and Heterologous Expression of the Gene Cluster, *Journal of Bacteriology 188*, 1236-1244, 2006.
- [73] Volkman J. K., Sterols in microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 495-506, 2003.
- [74] Volkman J. K., A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter, *Organic Geochemistry 9,* 83-99, 1986.
- [75] Dykstra C. M., Giles H. D., Banerjee S., y Pavlostathis S. G., Biotransformation of phytosterols under aerobic conditions, *Water research* 58, 71-81, 2014.
- [76] Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., y Lampi A. M., Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition, *Journal of the Science of Food and Agriculture 80*, 939-966, 2000.
- [77] Paoletti C., Pushparaj B., Florenzano G., Capella P., y Lercker G., Unsaponifiable matter of green and blue-green algal lipids as a factor of biochemical differentiation of their biomasses: II. Terpenic alcohol and sterol fractions, *Lipids 11*, 266-271, 1976.
- [78] Schwender J. *et al.*, Incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae, *FEBS Letters 414*, 129-134, 1997.
- [79] Borowitzka M. A., Algal biotechnology products and processes matching science and economics, *Journal of Applied Phycology 4*, 267-279, 1992.
- [80] Yoo C., Jun S.-Y., Lee J.-Y., Ahn C.-Y., y Oh H.-M., Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide, *Bioresource Technology* 101, S71-S74, 2010.
- [81] Hegewald E., Wolf M., Keller A., Friedl T., y Krienitz L., ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*, *Phycologia* 49, 325-335, 2010.
- [82] Juneja A., Ceballos R. M., y Murthy G. S., Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review, *Energies 6*, 4607-4638, 2013.
- [83] Herrera-Valencia V. A., Contreras-Pool P. Y., López-Adrián S. J., Peraza-Echeverría S., y Barahona-Pérez L. F., The green microalga *Chlorella*

*saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production, *Current Microbiology* 63, 151-157, 2011.

- [84] Pérez Pazos J. V. y Fernández Izquierdo P., Synthesis of neutral lipids in Chlorella Sp. under different light and carbonate conditions, CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro 4, 47-58, 2011.
- [85] Liu J., Yuan C., Hu G., y Li F., Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166, 2127-2137, 2012.
- [86] Pruvost J., Van Vooren G., Le Gouic B., Couzinet-Mossion A., y Legrand J., Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application, *Bioresource Technology 102*, 150-158, 2011.
- [87] Nanduca Nolasco H., Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos, Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., México, 2015.
- [88] Us Vázquez R., Efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp., Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., México, 2011.
- [89] Perez-Garcia O., Escalante F. M. E., de-Bashan L. E., y Bashan Y., Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Research 45*, 11-36, 2011.
- [90] Lowrey J., Brooks M. S., y McGinn P. J., Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review, *Journal of Applied Phycology* 27, 1485-1498, 2015.
- [91] Arbib Z., Ruiz J., Álvarez-Díaz P., Garrido-Pérez C., y Perales J. A., Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production, *Water research 49*, 465, 2014.
- [92] Batista A. P. *et al.*, Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production an integrated microalgae-based approach, *Bioresource Technology 184*, 230-235, 2015.

- [93] Hodaifa G., Sánchez S., Martínez M. E., y Órpez R., Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium, *Applied Energy 104*, 345-352, 2013.
- [94] Aravinthan V., Story N., y Yusaf T., Nutrient removal of nursery and municipal wastewater using *Chlorella vulgaris* microalgae for lipid extraction, *Desalination and water treatment* 52, 727-736, 2014.
- [95] Kong Q.-x., Li L., Martinez B., Chen P., y Ruan R., Culture of microalgae Chlamydomonas reinhardtii in wastewater for biomass feedstock production, Applied Biochemistry and Biotechnology 160, 9-18, 2010.
- [96] Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., y Bux F., Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production, *Applied Energy* 88, 3411-3424, 2011.
- [97] Bohutskyi P. *et al.*, Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate, *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 6139-6154, 2015.
- [98] Xin L., Hong-ying H., y Jia Y., Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent, *New Biotechnology* 27, 59-63, 2010.
- [99] Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R. W., y Das K. C., Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications, *Bioresource Technology 101*, 3097-3105, 2010.
- [100] Dittamart D., Pumas C., Pekkoh J., y Peerapornpisal Y., Effects of organic carbon source and light-dark period on growth and lipid accumulation of *Scenedesmus* sp AARL G022, *Maejo International Journal of Science and Technology 8*, 198-206, 2014.
- [101] Umamaheswari J. y Shanthakumar S., Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology 15*, 265, 2016.
- [102] Wang H. Y., Fu R., y Pei G. F., A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources, *African Journal* of *Microbiology Research* 6, 1041-1047, 2012.

- [103] Wan M. et al., The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 835-844, 2011.
- [104] Heredia-Arroyo T., Wei W., Ruan R., y Hu B., Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials, *Biomass and Bioenergy* 35, 2245-2253, 2011.
- [105] Liang Y., Sarkany N., y Cui Y., Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnology Letters 31*, 1043-1049, 2009.
- [106] Cerón García M. C., Sánchez Mirón A., Fernández Sevilla J. M., Molina Grima E., y García Camacho F., Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Process Biochemistry* 40, 297-305, 2005.
- [107] Gim G. H., Ryu J., Kim M. J., Kim P. I., y Kim S. W., Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions, *Journal of industrial microbiology & biotechnology 43*, 605, 2016.
- [108] Bhatnagar A., Chinnasamy S., Singh M., y Das K. C., Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters, *Applied Energy* 88, 3425-3431, 2011.
- [109] Jiang L., Wang X., Wang J., Liang S., Cen P., y Xu Z., Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses, *Bioresource Technology 100*, 3403-3409, 2009.
- [110] Najafpour G. D. y Poi Shan C., Enzymatic hydrolysis of molasses, *Bioresource Technology* 86, 91-94, 2003.
- [111] Ghorbani F., Younesi H., Esmaeili Sari A., y Najafpour G., Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by Saccharomyces cerevisiae, *Renewable Energy* 36, 503-509, 2011.
- [112] Hyenstrand P. *et al.*, Competition between the green alga Scenedesmus and the cyanobacterium Synechococcus under different modes of inorganic nitrogen supply, Hydrobiologia 435, 91-98, 2000.
- [113] Shi X.-M., Zhang X.-W., y Chen F., Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources, *Enzyme and Microbial Technology* 27, 312-318, 2000.

- [114] Shen Y., Yuan W., Pei Z., y Mao E., Heterotrophic culture of Chlorella protothecoides in various nitrogen sources for lipid production, Applied Biochemistry and Biotechnology 160, 1674-1684, 2010.
- [115] Ganuza E., Anderson A. J., y Ratledge C., High-cell-density cultivation of Schizochytrium sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system, *Biotechnology* Letters 30, 1559-1564, 2008.
- [116] Mandal S. y Mallick N., Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology 84*, 281-291, 2009.
- [117] Griffiths M. J. y Harrison S. T. L., Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *Journal of Applied Phycology 21*, 493-507, 2009.
- [118] Arumugam M., Agarwal A., Arya M. C., y Ahmed Z., Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*, *Bioresource Technology* 131, 246-249, 2013.
- [119] Widjaja A., Chien C.-C., y Ju Y.-H., Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40, 13-20, 2009.
- [120] Ördög V., Stirk W. A., Bálint P., Lovász C., Pulz O., y van Staden J., Lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella* and *Scenedesmus* strains grown in nitrogen-stressed conditions, *Journal of Applied Phycology* 25, 233-243, 2013.
- [121] Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P., y Del Borghi M., Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification 48*, 1146-1151, 2009.
- [122] Wang Z. T., Ullrich N., Joo S., Waffenschmidt S., y Goodenough U., Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryotic Cell 8*, 1856-1868, 2009.
- [123] Takagi M., Watanabe K., Yamaberi K., y Yoshida T., Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999, *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 112-117, 2000.

- [124] Stephenson A. L., Dennis J. S., Howe C. J., Scott S. A., y Smith A. G., Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks, *Biofuels* 1, 47-58, 2010.
- [125] Kilham S. S., Kreeger D. A., Goulden C. E., y Lynn S. G., Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*, *Freshwater Biology* 38, 591-596, 1997.
- [126] Lynn S. G., Kilham S. S., Kreeger D. A., y Interlandi S. J., Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 36, 510-522, 2000.
- [127] Kolber Z., Zehr J., y Falkowski P., Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II, *Plant Physiology* 88, 923-929, 1988.
- [128] Huang G., Chen F., Chen G., Wei D., y Zhang X., Biodiesel production by microalgal biotechnology, *Applied Energy* 87, 38-46, 2010.
- [129] May Cua E. R., Cultivo de la microalga Scenedesmus sp. en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa, Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C, México, 2015.
- [130] Huerlimann R., de Nys R., y Heimann K., Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production, *Biotechnology* and *Bioengineering* 107, 245-257, 2010.
- [131] Dewan A., Kim J., McLean R. H., Vanapalli S. A., y Karim M. N., Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays, *Biotechnology and Bioengineering* 109, 2987-2996, 2012.
- [132] Sharma K. K., Schuhmann H., y Schenk P. M., High lipid induction in microalgae for biodiesel production, *Energies 5*, 1532-1553, 2012.
- [133] Qin J. G., Hydrocarbons from Algae, K. N. Timmis, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2817-2826.
- [134] Meng X., Pan Q., Ding Y., y Jiang L., Rapid determination of phospholipid content of vegetable oils by FTIR spectroscopy combined with partial least-square regression, *Food chemistry* 147, 272-278, 2014.

- [135] Alzate Gaviria L. M. *et al.*, Evaluación del desempeño e identificación de exoelectrógenos en dos tipos de celdas de combustible microbianas con diferente configuración en el ánodo, *Interciencia* 35, 9-25, 2010.
- [136] Perez-Garcia O., de-Bashan L. E., Hernandez J. P., y Bashan Y., Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with azospirillum brasilense1, *Journal of Phycology 46*, 800-812, 2010.
- [137] Aguilera J., Jiménez C., Rodríguez-Maroto J. M., y Niell F. X., Influence of subsidiary energy on growth of *Dunaliella viridis Teodoresco*: the role of extra energy in algal growth, *Journal of Applied Phycology* 6, 323-330, 1994.

## Anexo I. Formulaciones de Agua Residual Sintética

Reactivo	Cantidad por litro
Azúcar comestible	4 g
Ácido acético glacial	0.5g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.0 g
NaHCO <sub>3</sub> comercial	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
NH₄CI	1.0 g
Agua destilada	1000 mL

Formulación Alzate et al. 2007 [135]

Formulación Pérez et al. 2007 (modificada) [136]

Reactivo	Cantidad por litro	
NaCl	10 mg	
CaCl <sub>2</sub>	2 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.100 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.050 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 mg	
NH₄CI	192 mg	
Glucosa	10 g	
Agua destilada	1000 mL	

## Anexo II. Formulación del Medio TAP

## Medio TAP

Reactivo	Cantidad por litro	
Tris base	20 mL	
Buffer de fosfatos II	1 mL	
Metales traza Hutner	1 mL	
Solución A	10 mL	
Ácido acético glacial (pH de 7.0)	1 mL	
Aforar a 1000 mL con agua bidestilada		

## Soluciones stock

Solución A			
Reactivo	Cantidad para 500 mL (H <sub>2</sub> O)		
NH₄CI	20 g		
MgSO₄·2H₂O	5 g		
CaCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5 g		

Buffer de fosfatos II			
Reactivo	Cantidad para 100 mL (H <sub>2</sub> O)		
K₂HPO₄	10.8 g		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.6 g		

Metales traza Hutner			
Reactivo	Cantidad para 1 L (H <sub>2</sub> O)		
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	11.4 g		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22.0 g		
MnCl2·4 H <sub>2</sub> O	5.06 g		
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	4.99 g		
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1.61 g		
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	1.57 g		
Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> 4(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1.1 g		

Tris base		
Reactivo	Cantidad para 200 mL (H <sub>2</sub> O)	
Tris base	24.228 g	

Anexo III. Curva de crecimiento de la microalga Coelastrum sp. en ARSA



Los datos graficados corresponden al promedio de la concentración celular de los reactores 1 y 2 (duplicado). El reactor No. 3 (triplicado) presentó una curva de crecimiento atípica en comparación con los otros reactores, debido a un problema con la agitación en el sistema mecánico empleado. La agitación del cultivo microalgal es considerada "energía subsidiaria" que tiene efectos importantes en la producción celular, producción de biomasa y algunos productos comerciales importantes [137]. Acorde a lo mencionado, el reactor 3 se mantuvo bajo condiciones de cultivo diferentes a las de los reactores 1 y 2, por lo tanto se descartó del presente estudio.

Anexo IV. Curva de crecimiento de la microalga Coelastrum sp. en ARS $_P$  (sin melaza)



Anexo V. Producción de biomasa y contenido	lipídico de los cultivos	ARS <sub>A</sub> y ARS <sub>P</sub>
--	--------------------------	-------------------------------------

Cultivo	Peso de biomasa seca (g·L⁻¹)	Peso del extracto lipídico (g·L <sup>-1</sup> )	Porcentaje de lípidos (% w/w)
ARS <sub>A</sub>	1.40 ± 0.20	0.39 ± 0.13	28
ARS <sub>P</sub>	0.32 ± 0.07	0.13 ± 0.02	40

Fracción	Compuesto	Peso (mg)	Peso (mg·L <sup>-1</sup> )	% del extracto lipídico (w/w)	
	Ex	tracto de AR	S <sub>A</sub>		
1	Hidrocarburos	7.6	13.2	3	
2	Triglicéridos	53.0	92.1	24	
3	Esteroles y alcoholes grasos	24.8	43.1	11	
4	Terpenos	1.7	3.0	1	
5	Fosfolípidos	64.5	112.1	29	
Total		222.8	387.2		
	Extracto de ARS <sub>P</sub>				
1	Hidrocarburos	3.4	4.5	4	
2	Triglicéridos	21.6	28.8	23	
3	Esteroles y alcoholes grasos	8.6	11.5	9	
4	Terpenos	3.8	5.1	4	
5	Fosfolípidos	20.3	27.1	22	
	Total	94.4	126.0		

# Anexo VI. Relación de peso y porcentaje de las fracciones $ARS_A$ y $ARS_P$ eluidas

## Anexo VII. Cromatogramas



 $\mathsf{ARS}_{\mathsf{P}}$ 

**ARS**<sub>A</sub>



ARS<sub>P</sub>+7



TAP15



TAP5



 $ASR_P+15$ 



 $\mathsf{ARS}_{\mathsf{P}}\mathsf{-}\mathsf{N}$ 



TAP-N

