



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biotecnología

“Biorrefinería a partir de la microalga *Scenedesmus
obtusiusculus* AT-UAM: Producción de lípidos y pigmentos”

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A :

M. en B. León Sánchez García

Matricula: 2141801392

ORCID: 0009-0004-3457-9919

Correo: leonsanchezgarcia@gmail.com

Director de tesis

Dra. Marcia Morales Ibarría

Asesores: Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Dr. Roberto Olivares Hernández

Jurado

Presidente: Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Secretario: Dr. Juan José Cabello Robles

Vocal: Dr. Luis Carlos Fernández Linarez

Vocal: Dra. María Laura González Reséndiz

Iztapalapa, Ciudad de México, 20 de mayo de 2025

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad, PNCP) de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), con la referencia 001466.

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Emisiones Gaseosas de la UAM-Iztapalapa y en los Laboratorios y Planta Piloto de Bioprocesos de la UAM-Cuajimalpa

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca de doctorado de León Sánchez García (CVU 421689).

Agradecimientos

A mi madre y a mi tío, que, aunque ya no están físicamente, su recuerdo ha sido mi mayor fortaleza. Les agradezco profundamente por haberme impulsado siempre a ser mejor y por sembrar en mí la semilla de la perseverancia.

A Nayely y a Luna, mi núcleo, mi hogar. Gracias por su paciencia infinita, por sostener mis días y por celebrar cada pequeño avance como si fuera el más grande. Su compañía y amor incondicional han sido el motor que me ha permitido llegar hasta aquí. Este camino fue menos difícil porque lo recorrimos juntos.

A mis hermanos. Gracias por estar siempre, por su apoyo constante y por celebrar conmigo cada momento importante. Su presencia ha sido un ancla y un refugio en todo este trayecto.

A la Dra. Marcia Morales, mi más profundo agradecimiento por su confianza, su guía y su acompañamiento no solo en el desarrollo de esta tesis, sino a lo largo de toda mi formación profesional. Gracias por sus consejos, por impulsarme a crecer y por brindarme siempre un espacio para aprender y equivocarme con libertad.

Al Dr. Gabriel Viguera, gracias por ser un mentor y un guía constante. Su apoyo, sus palabras precisas y su disposición para orientarme han sido fundamentales para dar forma a este trabajo y a mi desarrollo como investigador.

A Sergio Hernández, mi eterno maestro. Gracias por permitirme colaborar con usted y por compartir su conocimiento de manera tan generosa. Siempre habrá algo nuevo que necesite aprender de usted, y eso es algo que valoro inmensamente.

Un agradecimiento especial a David Campos, maestro en el taller mecánico de la UAM Iztapalapa, por su valioso apoyo técnico en la construcción de los sistemas que se utilizaron a lo largo de este proyecto. Su habilidad, dedicación y disposición hicieron posible que las ideas tomaran forma y que los reactores y equipos funcionaran.

A los Doctores Alma Toledo y Juan Cabello, mis compañeros de ruta desde el inicio de esta aventura. Gracias por las interminables discusiones, por los consejos certeros y, sobre todo, por su amistad.

A Laura González, Adriana Marín, Ingrid Hernández, Pilou Gorry, Mauricio Carrasco, Ariel Mendoza, David Ramírez, Fernanda Hernández y Rebeca Pérez, gracias por su colaboración, por los momentos compartidos y por hacer de la Planta Piloto un espacio de crecimiento colectivo. A todos los amigos que he tenido la fortuna de conocer y con los que he colaborado, gracias por acompañarme.

Índice

Índice.....	I
Índice de Tablas.....	IV
Índice de figuras.....	V
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Capítulo 1. Antecedentes.....	8
1.1 <i>Microalgas</i>	8
1.2 <i>Biodiesel</i>	9
1.3 <i>Metabolitos de microalgas</i>	10
1.3.1 <i>Ácidos grasos poliinsaturados</i>	11
1.3.2 <i>Carbohidratos</i>	11
1.3.3 <i>Polisacáridos</i>	12
1.3.4 <i>Proteínas y aminoácidos</i>	13
1.3.5 <i>Pigmentos</i>	15
1.4 <i>Producción y tratamiento de biomasa microalgal</i>	16
1.4.1 <i>Sistemas de producción y condiciones para obtención de productos de interés</i>	16
1.5 <i>Biorrefinerías</i>	16
1.6 <i>Análisis tecno-económico</i>	18
1.7 <i>Antecedentes directos</i>	19
Capítulo 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	21
2.1 <i>Justificación</i>	21
2.2 <i>Hipótesis</i>	22
2.3 <i>Objetivos</i>	23
2.3.1 <i>Objetivo general</i>	23
2.3.2 <i>Objetivos particulares</i>	23
Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	24
3.1 <i>Diagrama de flujo</i>	24
3.2 <i>Microorganismo</i>	25
3.3 <i>Propagación y medio de cultivo</i>	25
3.4 <i>Sistemas de cultivo</i>	26
3.4.1 <i>Fotobiorreactor de Placas Planas (FPP)</i>	26
3.4.2 <i>Fotobiorreactor de columna de burbujeo (CB)</i>	27
3.4.3 <i>Estanque tipo circuito ó Raceway pond (120 L)</i>	28
3.4.4 <i>Estanque tipo circuito ó Raceway pond (950 L)</i>	29
3.4.5 <i>Fotobiorreactor híbrido (FBRH)</i>	30
3.4.6 <i>Adquisición de datos temperatura y luz en sistemas a la intemperie</i>	31
3.5 <i>Métodos analíticos</i>	31
3.5.1 <i>Determinación de biomasa por peso seco</i>	31
3.5.2 <i>Determinación de nitratos</i>	32
3.5.3 <i>Determinación del contenido de proteínas</i>	32
3.5.4 <i>Determinación del contenido de carbohidratos</i>	32
3.5.5 <i>Determinación del contenido de clorofilas</i>	32
3.5.6 <i>Cuantificación de luteína</i>	33

3.5.7	Cuantificación de lípidos	33
3.5.8	Extracción y cuantificación de lípidos	34
3.5.9	Identificación de los ácidos grasos	34
3.5.10	Análisis elemental	34
3.5.11	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	35
3.6	Determinación de los parámetros cinéticos de la biomasa	35
3.7	Análisis Tecno-Económico	37
3.7.1	Parámetros y software	37
3.8	Análisis estadístico	37
Capítulo 4. Efecto de la acidificación controlada sobre el aumento de la acumulación de lípidos en la microalga <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM en condiciones controladas y en la intemperie.		
4.1	Resumen	38
4.2	Introducción	38
4.3	Materiales y métodos	40
4.3.1	Cepa y medio de cultivo	40
4.3.2	Fotobiorreactores	40
4.3.3	Fotobiorreactor de Columna de Burbujeo y Raceway Pond operados en la intemperie.	41
4.3.4	Estrategias para la evaluación de la acidificación del medio de cultivo y la acumulación de lípidos.	42
4.3.4.1	Fotobiorreactor de Placas Planas operado en condiciones controladas..	42
4.3.4.2	Limitación de nitrógeno bajo acidificación en sistemas a la intemperie	42
4.3.5	Métodos analíticos	43
4.3.5.1	Análisis de la biomasa	43
4.3.5.2	Parámetros cinéticos	43
4.4	Resultados	43
4.4.1	Evaluación de la acumulación de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno y acidificación controlada en el FPP nivel laboratorio.	43
4.4.2	Cultivo en la intemperie bajo condiciones de crecimiento en un FCB	51
4.4.3	Cultivo a la intemperie en un FCB bajo limitación de nitrógeno y pH ácido	54
4.4.4	Cultivo en RWP bajo condiciones de suficiencia y limitación de nitrógeno en la intemperie.	56
4.4.5	Perfil de FAMES	60
4.5	Conclusión	62
Capítulo 5. Cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM para la captura de CO₂ y producción de luteína.		
5.1	Resumen	63
5.2	Introducción	63
5.3	Materiales y Métodos	66
5.3.1	Cepa y medio de cultivo	66
5.3.2	Fotobiorreactor	67
5.3.3	Estrategias para la evaluación de los métodos de lisis celular	67
5.3.4	Estrategia para la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno en un Fotobiorreactor de Placas Planas operado en condiciones controladas	67

5.3.5	<i>Estrategia para la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno en un Fotobiorreactor de Placas Planas operado en condiciones controladas.....</i>	68
5.3.6	<i>Métodos analíticos.....</i>	68
5.4	<i>Resultados</i>	68
5.4.1	<i>Evaluación de los métodos de lisis celular.....</i>	68
5.4.2	<i>Efecto de la fuente de nitrógeno en la acumulación de luteína.....</i>	70
5.4.3	<i>Efecto de la limitación de nitrógeno en la acumulación de luteína.....</i>	71
5.5	<i>Conclusiones.....</i>	73
Capítulo 6. Evaluación del cultivo a gran escala de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM, para el acondicionamiento de una corriente de gases de combustión para la producción de biomasa		
6.1	<i>Resumen</i>	74
6.2	<i>Introducción.....</i>	74
6.3	<i>Materiales y métodos</i>	79
6.3.1	<i>Cepa y medio de cultivo</i>	79
6.3.2	<i>Fotobiorreactores</i>	80
6.3.3	<i>Sistemas RWP y FBRH operados en la intemperie.</i>	80
6.3.4	<i>Gases de combustión.....</i>	80
6.3.5	<i>Evaluación del quitosano para la recuperación de la biomasa microalgal.....</i>	81
6.3.6	<i>Estrategias para la evaluación del acondicionamiento de una corriente de gases de combustión.</i>	81
6.3.6.1	<i>Evaluación del crecimiento de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM con medio de cultivo alternativo.....</i>	81
6.3.6.2	<i>Acondicionamiento de una corriente real de gases de combustión..</i>	82
6.3.7	<i>Métodos analíticos.....</i>	82
6.3.7.1	<i>Análisis de la biomasa.....</i>	82
6.3.7.2	<i>Parámetros cinéticos.....</i>	82
6.4	<i>Resultados.....</i>	82
6.4.1	<i>Evaluación del crecimiento de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM en un sistema RWP.....</i>	82
6.4.2	<i>Perfil bioquímico.....</i>	85
6.4.3	<i>Operación del RWP en semi-continuo.....</i>	87
6.4.4	<i>Evaluación del crecimiento de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM en un sistema híbrido.....</i>	88
6.4.5	<i>Recuperación de la biomasa con quitosano.....</i>	92
6.5	<i>Conclusión.....</i>	93
Capítulo 7. Evaluación Tecno-Económica para la implementación de una biorrefinería para la producción de lípidos y pigmentos a partir de la microalga <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM.....		
7.1	<i>Resumen</i>	95
7.2	<i>Introducción.....</i>	95
7.3	<i>Base de cálculo y metodología.....</i>	97
7.3.1	<i>Definición de proceso.....</i>	97
7.3.2	<i>Sistema de cultivo y recuperación de la biomasa.....</i>	98
7.3.3	<i>Recuperación de la biomas y disrupción celular</i>	100
7.3.4	<i>Extracción cloroformo/metanol.....</i>	100
7.2.5	<i>Extracción de lípidos y separación de luteína</i>	101
7.3.6	<i>Extracción y separación II.....</i>	102

7.3.7 Purificación de la luteína.....	102
7.3.8 Análisis económico.....	103
7.3.8.1 Ingresos.....	103
7.4 Resultados y discusión.....	104
7.4.1 Diagrama de proceso y dimensionamiento.....	104
7.4.2 Evaluación económica.....	105
7.5 Conclusión.....	109
Capítulo 8. Conclusiones y perspectivas.....	111
8.1 Conclusiones.....	111
8.2 Perspectivas.....	112
Capítulo 9. Referencias.....	113
Anexo 1. Lista de Productos.....	125
Anexo 2. Participación en congresos.....	126

Índice de Tablas

<i>Tabla 1.1. Contenido lipídico de algunas microalgas (Adaptado de Chisti, 2007).....</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 1.2. Carbohidratos de algunas especies de microalgas (Adaptado de Markou, 2012).....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 1.3. Función farmacológica de algunas microalgas. (Adaptado de Yen et al., 2012).....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 1.4. Perfil de aminoácidos de diferentes tipos de algas, en comparación con las fuentes de proteínas convencionales y la FAO / OMS (1973) patrón de referencia (g por 100 proteínas).....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo BG11.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 3.2. Parámetros de operación de FCB.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 3.3. Parámetros de operación del RWP.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 4.1. Resumen de los resultados de biomasa y contenido lipídico de Scenedesmus obtusiusculus AT-UAM bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno y limitación de nitrógeno con acidificación controlada, evaluado en diferentes sistemas y condiciones (laboratorio e Intemperie).....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 4.2. Perfil de FAMES en los lípidos acumulados en condiciones de laboratorio y en la intemperie.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 5.1. Comparación de los métodos de disrupción celular.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 5.2. Comparación de cepas acumuladoras de luteína.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 6.1. Comparación de los medios de cultivo BG-11 y Bayfolan forte.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 6.2. Parámetros de operación del sistema RWP.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 6.3. Condiciones de cultivo, remoción de gases, parámetros de crecimiento de Scenedesmus obtusiusculus AT-UAM en un sistema híbrido alimentada con gas de combustión.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 6.4. Comparación de la cantidad de floculante para diferentes especies de microalgas. Adaptado de (Lama et al., 2016).....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 7.1. Parámetros de operación en el reactor RWP.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 7.2. Parámetros de reacción de extracción/separación.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 7.3. Tiempo de operación y producción anual.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabla 7.4. Costos de adquisición de equipos.....</i>	<i>105</i>

Tabla 7.5. Costo directo de la instalación de la planta (USD)	107
Tabla 7.6. Costo indirecto total de la planta	107
Tabla 7.7. Honorarios y Contingencia	107
Tabla 7.8. Costos de mano de obra	107
Tabla 7.9. Costos de operación anual	108
Tabla 7.10. Resumen ejecutivo del análisis económico	108

Índice de figuras

Figura 1.1. Vista esquemática de la estructura de la pared celular de especies de microalgas de importancia biotecnológica (adaptado de D`Hont et al., 2017)	10
Figura 3.1. Estrategia experimental	24
Figura 3.2. Fotobiorreactor de Placas Planas	27
Figura 3.3. Fotobiorreactor de Columna de Burbujeo	28
Figura 3.4. Raceway pond 120L	29
Figura 3.5. Sistema RWP 950 L	30
Figura 3.6. Configuración del Fotobiorreactor Híbrido	31
Figura 4.1. Fotobiorreactores para el cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM a) Fotobiorreactor de Placas Planas (FPP), b) Fotobiorreactor de columna de burbujeo (FCB) y c) Raceway pond (RWP).....	41
Figura 4.2. Efecto del CO₂ en el cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM, condiciones abióticas (●), condiciones iniciales de limitación de nitrógeno (■), condición de limitación de nitrógeno (▲)	44
Figura 4.3. a) efecto del pH 5.5 constante en condiciones de N-limitado, b) Efecto del pulso ácido, a las 80 horas, para alcanzar un pH de 5.5 bajo condiciones de N-limitado, en el cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM en un fotobiorreactor de placas planas, FPP; biomasa (●), proteínas (■), carbohidratos (◆) y lípidos (▲) ...	47
Figura 4.4. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	50
Figura 4.5. <i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM cultivada en un fotobiorreactor FCB, con pulso ácido, biomasa, lípidos, pH, oxígeno disuelto, irradiancia y temperatura del medio operado en la intemperie	55
Figura 4.6. Acumulación de lípidos en el sistema Raceway Pond, RWP, con N-limitado (□) y N-limitado + pulso ácido (●)	57
Figura 5.1. Propiedades de la Luteína a) Solubilidad, b) Estructura molecular, c) Propiedades fisicoquímicas y d) Espectro de absorción. Adaptado de Iwamoto et al., (2024)	64
Figura 5.2. Producción de luteína utilizando diferentes fuentes de nitrógeno, NaNO₃ (▲), Urea (●), (NH₄)₂SO₄ (■)	70
Figura 5.3. Producción de luteína bajo diferentes condiciones de crecimiento. N-completo (●), N-limitado (■)	72
Figura 6.1. Flujo del carbono a través de la membrana celular	76
Figura 6.2. Fotobiorreactores para el cultivo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM a) RWP y b) FBRH.....	80
Figura 6.3. Crecimiento de <i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM en un RWP en la intemperie ..	83

Figura 6.4. Irradiancia en el medio de cultivo.....	84
Figura 6.5. Perfil bioquímico de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>. AT-UAM cultivada en un RWP en condiciones de crecimiento.....	86
Figura 6.6. Operación en semi-continuo del RWP.....	87
Figura 6.7. Cinética de crecimiento reactor híbrido con aire.....	89
Figura 6.8. Fijación del Carbono, Carbono fijado en la biomasa (•), carbono inorgánico fijado en el medio de cultivo (◐).....	90
Figura 6.9. Evaluación de la eficiencia de floculación con quitosano.....	92
Figura 7.1. Diagrama del sistema RWP para el cultivo de biomasa.....	99
Figura 7.2. Diagrama de la sección de recuperación y disrupción de la biomasa microalgal.....	100
Figura 7.3. Diagrama de la sección de extracción con solventes orgánicos.....	101
Figura 7.4. Diagrama de la sección de saponificación y separación de las fases orgánica y acuosa.....	101
Figura 7.5. Diagrama de extracción y separación.....	102
Figura 7.6. Diagrama de la obtención de luteína libre.....	103
Figura 7.7. Diagrama de proceso para la obtención de luteína y biodiesel.....	104
Figura 7.8. Costo de los equipos principales de proceso.....	106

Resumen

En el contexto del cambio climático y la disminución de reservas de petróleo, la búsqueda de energías renovables y sostenibles ha llevado a explorar alternativas como los biocombustibles derivados de microalgas. Las microalgas, especialmente *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, destaca por su capacidad para acumular lípidos y metabolitos de alto valor comercial. Esta tesis doctoral evalúa el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en la producción de biodiesel y otros compuestos de interés bajo el concepto de biorrefinería, integrando procesos técnicos y económicos para mejorar la viabilidad a escala industrial. Para aumentar el contenido de lípidos en la biomasa se evaluó la acidificación controlada del medio de cultivo a pH 5.5, combinada con limitación de nitrógeno, demostró ser una estrategia efectiva para incrementar la acumulación de lípidos en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. En condiciones controladas en el Fotobiorreactor de Placas Planas (FPP), se alcanzó un 60% de lípidos con respecto al peso seco y una productividad de 85 mg_{lípidos} L⁻¹ d⁻¹, duplicando los valores obtenidos solo con la limitación de nitrógeno y sin acidificación. Esta estrategia también fue validada en los sistemas Fotobiorreactor de Columna de Burbujeo (FCB) y Raceway Pond (RWP) operados en la intemperie bajo condiciones de limitación de nitrógeno, donde el contenido lipídico aumentó de 24% a 45% del peso seco, cuando se aplicó la acidificación controlada y limitación de nitrógeno. Los análisis ultraestructurales revelaron cambios significativos en la pared celular y los cloroplastos bajo condiciones de estrés (limitación de nitrógeno), lo que sugiere una adaptación metabólica hacia la síntesis de lípidos. Estos resultados respaldan el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* para la producción sostenible de biodiesel, aunque se requiere optimizar el balance entre productividad de biomasa y acumulación de lípidos en escalas mayores, así como, el aprovechamiento de otros productos de interés como los pigmentos. *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM mostró capacidad para acumular luteína (4.2 mg g⁻¹ en condiciones óptimas), un carotenoide de alto valor comercial. La limitación de nitrógeno redujo el contenido de luteína (3.8 mg_{luteína} g_{biomasa}⁻¹). Entre los métodos de ruptura evaluados, el disruptor de perlas de vidrio fue el más eficiente (92% de eficiencia), seguido por criomolienda (47%) y sonicación (20%). Estos resultados destacan la importancia de seleccionar técnicas de ruptura celular escalables y económicas para maximizar la recuperación de pigmentos. La integración de la producción de luteína en un esquema de biorrefinería podría mejorar la viabilidad económica considerando además el uso de corrientes residuales de otros procesos como los gases de combustión. El cultivo

de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en sistemas abiertos (RWP) y sistemas híbridos (FBRH) confirmó su tolerancia a condiciones variables de intemperie y a diferentes concentraciones de CO₂ (hasta 5%). La microalga mostró una tasa de fijación de CO₂ de 0.95 g L⁻¹ d⁻¹, con productividades de biomasa de 36 mg L⁻¹ d⁻¹ en RWP. El uso de medios alternativos (fertilizantes foliares) redujo costos sin afectar el crecimiento, mientras que la floculación con quitosano demostró ser efectiva para la cosecha. Estos resultados apoyan el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM para su aplicación en el tratamiento de gases de combustión, no obstante, se requieren mejoras en la integración de los sistemas para escalar el proceso y garantizar su eficiencia. En este sentido se realizó la evaluación de un modelo de biorrefinería con el software SuperPro Designer v10®, basado en la producción simultánea de lípidos, luteína y biomasa residual, mostró viabilidad técnica y económica a partir de un análisis de costos de inversión, costos de operación y un análisis de prefactibilidad. Lo anterior, sustentado en los indicadores financieros como el retorno sobre la inversión del 18.35 %, VPN positivo (USD 2 millones), una TIR de 8.36%, con un periodo de recuperación de la inversión de 5.45 años. Sin embargo, se identificó que el costo unitario de la producción de luteína debe mejorarse a través de la optimización del proceso y en el escalamiento. Este trabajo establece las bases para un Análisis Tecnológico Económico aplicable a un modelo de biorrefinerías de microalgas, donde un escalamiento exitoso dependerá de integrar estratégicamente los procesos de cultivo, operación, purificación, valorización de subproductos y estudios de mercado. Este modelo se posiciona como una solución sostenible que combina bioenergía y economía circular, ofreciendo una alternativa viable ante los desafíos climáticos y energéticos globales.

Abstract

In the context of climate change and declining petroleum reserves, the search for renewable and sustainable energy sources has led to the exploration of alternatives such as microalgae-derived biofuels. Microalgae, particularly *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, stand out for their ability to accumulate lipids and high-value metabolites such as pigments (lutein). This doctoral thesis evaluates the potential of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for biodiesel production and other valuable compounds within a biorefinery framework, integrating technical and economic processes to enhance industrial viability. To increase lipid content in the biomass, controlled acidification of the culture medium to pH 5.5 combined with nitrogen limitation proved to be an effective strategy for enhancing lipid accumulation in *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Under controlled conditions (flat panel photobioreactors, FPP), lipid content reached 60% (85 mg L⁻¹ d⁻¹), doubling the values obtained without acidification. This strategy was also validated in outdoor systems (bubble column photobioreactors, FCB and raceway ponds, RWP), where lipid content increased from 24% to 45%. Ultrastructural analyses revealed significant changes in cell walls and chloroplasts under stress conditions, suggesting a metabolic adaptation toward lipid synthesis. These results support the potential of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for sustainable biodiesel production, although optimization of the balance between biomass productivity and lipid accumulation at larger scales is required, along with the utilization of other valuable products such as pigments. *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM demonstrated the ability to accumulate lutein (4.2 mg g⁻¹ under optimal conditions), a high-value carotenoid. Nitrogen limitation reduced lutein concentration (3.8 mg g⁻¹) but increased extraction efficiency due to changes in cell wall structure. Among the cell disruption methods evaluated, bead milling was the most efficient (92% efficiency), followed by cryogrinding (47%) and sonication (20%). These results highlight the importance of selecting scalable and cost-effective cell disruption techniques to maximize pigment recovery. The integration of lutein production into a biorefinery scheme could improve economic viability, particularly when considering the use of residual streams from other processes such as flue gases. The cultivation of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM in open systems (RWP) and hybrid systems (FBRH) confirmed its tolerance to variable outdoor conditions and different CO₂ concentrations (up to 5%). The microalgae showed a CO₂ fixation rate of 0.95 kg m⁻³ d⁻¹, with biomass productivities of 36 mg L⁻¹ d⁻¹ in RWP. The use of alternative culture media (foliar fertilizers) reduced costs without affecting growth, while chitosan flocculation proved

effective for biomass harvesting. These results support the potential of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for bioremediation and carbon capture applications, although reactor design adjustments are needed for process scaling. In this context, an evaluation was conducted of a proposed biorefinery model based on the simultaneous production of lipids, lutein, and residual biomass, which demonstrated both technical and economic viability. This was supported by key financial indicators including an 18.35% return on investment (ROI), positive NPV (USD 2 million), an IRR of 8.36%, and a payback period of 5.45 years. However, it was identified that the unit production cost of lutein needs improvement through process optimization and scaling. This work establishes the foundation for a Techno-Economic Analysis applicable to a microalgae-based biorefinery model, where successful scaling will depend on the strategic integration of cultivation processes, operations, purification, byproduct valorization, and market studies. The model positions itself as a sustainable solution that combines bioenergy and circular economy principles, offering a viable alternative to address global climate and energy challenges.

Introducción

En las últimas décadas, la creciente preocupación por el calentamiento global, impulsado por las emisiones de gases de efecto invernadero como el CO₂, y la inevitable disminución de las reservas de combustibles fósiles, han ejercido una presión sin precedentes para transitar hacia un modelo energético y productivo más sostenible (Ho et al., 2010; Xu et al., 2023). En este contexto, las microalgas han emergido como una plataforma biotecnológica de gran interés. Estos microorganismos fotosintéticos poseen la capacidad única de fijar CO₂ atmosférico o de fuentes puntuales (como gases de combustión) y convertirlo, utilizando la energía solar, en una biomasa rica en compuestos de alto valor comercial (Chisti, 2007; Wang et al., 2023).

Entre estos compuestos, los lípidos destacan por su potencial como materia prima para la producción de biodiesel de tercera generación, ofreciendo ventajas sobre los cultivos terrestres, como una mayor productividad por unidad de área y la no competencia con tierras de cultivo (Wijffels et al., 2010). Sin embargo, a pesar de este potencial, la producción de biodiesel a partir de microalgas aún no es económicamente viable a gran escala. El principal cuello de botella radica en los altos costos asociados al cultivo, la cosecha y la extracción de aceites, que superan con creces el valor del combustible obtenido (Stephens et al., 2010).

Para superar esta barrera, la investigación actual se ha orientado hacia el concepto de biorrefinería de microalgas. Este enfoque propone el aprovechamiento integral de la biomasa, extrayendo no solo los lípidos para biocombustibles, sino también otros metabolitos de alto valor agregado que puedan subsidiar los costos del proceso (Yen et al., 2013; Laurens et al., 2017). Bajo este paradigma, compuestos como los pigmentos (luteína, astaxantina, β-caroteno), las proteínas o los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se convierten en productos diana cuya comercialización puede hacer financieramente factible todo el esquema productivo (Iwamoto et al., 2024). La luteína, un carotenoide con potentes propiedades antioxidantes y ampliamente utilizado en la industria nutracéutica y alimentaria para la salud visual, representa uno de estos coproductos de alto valor con un mercado global en expansión (MMR, 2024; Muhammad et al., 2024).

Así mismo, el paso de la escala de laboratorio a la producción comercial implica desafíos tecnológicos significativos, centrados principalmente en el diseño y operación de los sistemas de cultivo. Por un lado, los fotobiorreactores (FBR), como los de placas planas o

columnas de burbujeo, ofrecen un mayor control de las variables del proceso (temperatura, pH, concentración de nutrientes), minimizan la contaminación y permiten alcanzar altas productividades volumétricas. Sin embargo, su alto costo de construcción, operación y mantenimiento, así como las dificultades para escalarlos, limitan su aplicación industrial para productos de bajo valor como el biodiesel (Abdur Razzak et al., 2024). Por otro lado, los sistemas abiertos, como los estanques tipo Raceway Pond (RWP), son más económicos y fáciles de escalar, pero presentan desventajas como la baja productividad, la pérdida de agua por evaporación, la limitada transferencia de CO₂ y una alta susceptibilidad a la contaminación y a las fluctuaciones de las condiciones ambientales (Clagnan et al., 2023; Borowitzka, 2013).

A esto se suma la complejidad de las condiciones de cultivo. A nivel laboratorio, es posible mantener condiciones controladas y constantes (temperatura, pH, irradiancia, medio de cultivo definido como el BG-11) que permiten estudiar a detalle la fisiología de la cepa y los efectos de factores de estrés específicos, como la limitación de nitrógeno o la acidificación. Sin embargo, la transición a cultivos a la intemperie expone a las microalgas a ciclos circadianos de luz y temperatura, a variaciones estacionales ya la necesidad de utilizar medios de cultivo alternativos y de bajo costo (como fertilizantes foliares) para que el proceso sea económicamente factible. La cepa ideal debe, por tanto, poseer la robustez necesaria para mantener altas productividades y la capacidad de acumular los productos de interés bajo estas condiciones fluctuantes y no controladas (Morales et al., 2018).

En este contexto, la selección de la cepa adecuada es un pilar fundamental. La microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, aislada de un ambiente extremo en Cuatro Ciénegas, Coahuila, ha demostrado en trabajos previos del grupo de investigación un potencial excepcional. Se ha caracterizado por su alta tasa de fijación de CO₂ (hasta 0.95 kg m⁻³ d⁻¹), su tolerancia a altas concentraciones de CO₂ (hasta un 5%) y a las fluctuantes condiciones de cultivo a la intemperie, así como por su capacidad para acumular lípidos (hasta un 55% en condiciones de laboratorio) con un perfil de ácidos grasos apto para biodiesel (Toledo-Cervantes et al., 2018; Cabello et al., 2015). Sin embargo, para avanzar hacia una propuesta de biorrefinería, es crucial profundizar en el conocimiento de su metabolismo y explorar estrategias que permitan dirigirlo hacia la acumulación simultánea o secuencial de productos de interés, validando dichas estrategias no solo en condiciones controladas, sino también en sistemas abiertos de mayor escala y a la intemperie.

Por lo tanto, el presente trabajo de tesis doctoral se planteó con el objetivo de determinar el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en un esquema de biorrefinería para la producción de lípidos y luteína. Para ello, se abordó una investigación integral que incluyó: (i) la evaluación de estrategias de estrés, como la acidificación controlada del medio, para incrementar la acumulación de lípidos, validando su efectividad desde condiciones controladas de laboratorio (FPP) hasta sistemas piloto operados a la intemperie (FCB y RWP); (ii) el estudio de las condiciones de cultivo (fuentes de nitrógeno) y los métodos de procesamiento (como la disrupción celular) para optimizar la producción y recuperación de luteína; (iii) la evaluación del escalamiento del cultivo en sistemas abiertos (RWP) e híbridos, utilizando medios de cultivo alternativos (fertilizantes foliares) y una corriente real de gases de combustión para demostrar su robustez y aplicabilidad en un escenario de mitigación de emisiones; y (iv) la integración de todos los datos experimentales en un modelo de simulación de procesos para realizar un Análisis Tecnológico-Económico (ATE) que evalúe la viabilidad económica de una biorrefinería basada en esta cepa.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos autótrofos principalmente, que requieren de carbono inorgánico entre otros nutrientes para su crecimiento. Este carbono se fija dentro de las células y se convierte en macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas (Travieso et al., 2006, Sarma et al., 2021) que tienen un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas.

El cultivo de la biomasa de microalgas es considerado como una forma potencial de superar nuestra dependencia actual hacia los combustibles fósiles, por el alto contenido de aceite en algunas cepas (entre 17-77%, ver **Tabla 1.1**), los bajos índices de consumo de agua, alta productividad por unidad de área en comparación con otros cultivos, y la posibilidad de producción de microalgas sin usar áreas destinadas para el cultivo de alimentos. Estas ventajas han atraído a varias compañías petroleras, como Exxon, BP, Chevron, Shell y Neste Oil, para invertir en esta área de investigación (Mascarelli, 2009, Silva et al., 2020). Sin embargo, estudios recientes señalan que la producción de biodiesel a partir de los aceites de microalgas aún no es económicamente viable (Stephens et al., 2010).

Tabla 1.1. Contenido lipídico de algunas microalgas (Adaptado de Chisti, 2007).

Especie	% Contenido lipídico (g lípidos/g biomasa)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Crythecodium Cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	30-55
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

El contenido de aceites en las microalgas es variable, y su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, se refleja en una variedad de perfiles de ácidos grasos y en la habilidad de sintetizar diferentes compuestos de interés biotecnológico (Guschina y Harwood, 2006). Se han llevado a cabo diversos estudios para incrementar el contenido de aceites en las microalgas aplicando diferentes estrategia como :1) la limitación de nitrógeno durante el crecimiento, lo cual resulta eficiente en el incremento del contenido de aceites intracelulares, pero disminuye la concentración celular (Khozin-Goldberg, 2002; Solovchenko et al., 2008), 2) el crecimiento heterotrófico, que permite la obtención de mayor biomasa (Miao y Wu, 2004; Li et al., 2007), 3) la aplicación de ciclos de luz/oscuridad, que también favorece el metabolismo heterotrófico de ciertas microalgas, 4) la limitación de fósforo, que causa significantes cambios en perfil de ácidos grasos y contenido total de lípidos (Khozin-Goldberg y Cohen, 2006) y 5) la aplicación de diferentes niveles de salinidad, que también se ve reflejado en diferentes composiciones de lípidos intracelulares (Takagi et al., 2006).

1.2 Biodiesel

El biodiesel consiste en monoalquil ésteres de alcoholes de cadena corta, usualmente etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable y que es técnicamente capaz de sustituir al diésel derivado de petróleo como combustible (Al-lwayzy y Yusaf, 2017, Garibay et al., 2009). Y se obtiene a partir de los lípidos de las levaduras, bacterias, plantas y microalgas. Actualmente, las microalgas han cobrado gran relevancia por su capacidad de acumular lípidos precursores del biodiesel. La composición de estos lípidos en las microalgas varía, las principales fracciones son triacilgliceridos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, fosfolípidos, glucolípidos y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas). Por lo que, solo una fracción de los lípidos provenientes de las microalgas son útiles en la producción de biodiesel (Cohen, 1986, Dineshkumar et al., 2015).

De acuerdo con el potencial de las microalgas sería posible producir entre 20,000 a 80,000 litros de lípidos por hectárea por año, sin embargo, de acuerdo con el estado actual de la tecnología, la productividad no es mayor de 20,000 litros por hectárea por año. Y solo cuando se alcance un nivel de desarrollo mayor en cuanto a la tecnología, se podrá llegar a 80,000 litros por año. Aun así, estos volúmenes son considerablemente superiores a la producción de aceite a partir de plantas oleaginosas como: palma y colza que producen

entre 6,000 y 1,500 litros por hectárea por año, respectivamente (Wijffels et al., 2010, Wang et al., 2023).

La producción de biodiesel a partir de los aceites de microalgas con lleva cuatro pasos básicos que son: 1) Cultivo de la biomasa, 2) Separación de la biomasa del medio de cultivo, 3) Extracción de lípidos, 4) Transesterificación de los lípidos. Debido a que los lípidos están localizados dentro de la célula es necesaria la disrupción celular de las microalgas ya que la pared celular y algunas membranas, no permiten la extracción a partir de las células intactas. Lo anterior, debido a la diversidad estructural de las paredes celulares de las microalgas (**Figura 1.1**),

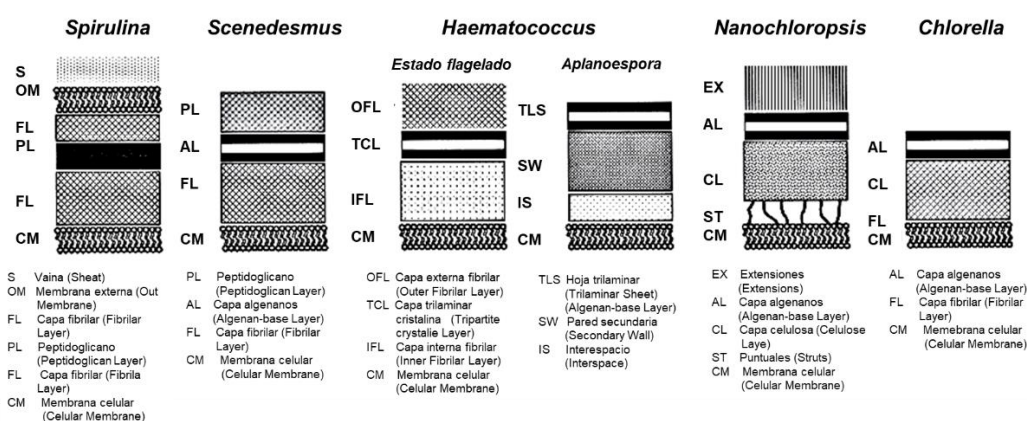


Figura 1.1. Vista esquemática de la estructura de la pared celular de especies de microalgas de importancia biotecnológica (adaptado de D’Hont et al., 2017)

1.3 Metabolitos de microalgas

Además de los lípidos que contienen las microalgas que pueden convertirse en biodiesel, la biomasa de microalgas también contiene otros componentes valiosos, incluyendo carbohidratos, lípidos, ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos y proteínas, que pueden tener un alto valor agregado y contribuir al desarrollo de productos refinados para diferentes aplicaciones (Laurens et al., 2017, Yen et al., 2012).

Actualmente los productos de microalgas que se encuentran comercialmente disponibles son dos órdenes de magnitud del precio al cual debería venderse el biodiesel que es por debajo de €0.50/Kg. Wijffels *et al.*, en 2010 determinaron el costo de producción de biomasa microalgal en un fotobiorreactor de panel delgado, escalado en 1 hectárea, obteniendo un valor aproximado de €9/Kg. Donde el principal gasto es en el consumo de energía y mano de obra.

Para lograr la reducción de los costos se deben considerar que las microalgas tienen un mecanismo fotosintético de partición de carbono que resulta en 30-50% proteínas, 20-40% carbohidratos y 8-15% lípidos, en condiciones favorable de crecimiento (Hu, 2004, Sánchez-García et al., 2020). Esto debe ser considerado en la producción de biomasa como materia prima no solo de biodiesel si no para productos de alto valor agregado como lo son las proteínas, carbohidratos y pigmentos. Algunos de estos productos se presentan a continuación.

1.3.1 Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con más de 20 átomos de carbono, son compuestos de alto valor en el mercado de alimentos saludables y son componentes esenciales para el crecimiento de eucariotas superiores (Romieu *et al.*, 2005., Ward y Singh, 2005). Nutricionalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:05) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:06) son los ácidos grasos tipo omega-3 más importantes que pertenecen a este grupo de compuestos bioactivos y proporcionan importantes beneficios para la salud de la población humana (Balk et al., 2004). Las microalgas son los productores iniciales de EPA y DHA y se ha estudiado el contenido en cepas de los géneros *Phaeodactylum* (Yongmanitchai y Ward, 1991), *Nannochloropsis* (Suknik, 1991), *Thraustochytrium* (Burja et al., 2006) y *Schizochytrium* (Zhu et al., 2007). Por lo que el desarrollo de un sistema eficiente de cultivo a gran escala para la producción comercial de EPA y DHA cubriría una importante necesidad mundial.

1.3.2 Carbohidratos

Las algas son capaces de acumular altos contenidos de carbohidratos (>50% de su peso seco) (Ho et al., 2012), en general los carbohidratos en las microalgas están constituidos por almidón, glucosa, celulosa/hemicelulosa y varios tipos de polisacáridos que actúan como componentes estructurales en la pared celular y como componentes de almacenamiento dentro de la célula proporcionando la energía necesaria para los procesos metabólicos y permiten la supervivencia temporal en condiciones de oscuridad (de Carvalho Silvello et al., 2022, Geider y La Roche 2002; Raven y Berdall, 2004). En la **Tabla 1.2** se muestran algunas especies y los carbohidratos que pueden acumular. Los más abundantes son glucosa, ramnosa, xilosa y manosa.

Tabla 1.2. Carbohidratos de algunas especies de microalgas (Adaptado de Markou, 2012).

Microalga Azúcar	<i>Chlorococcum</i> sp.	<i>Spirulina</i> <i>platensis</i>	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i>	<i>Nitzchia</i> <i>ciosterium</i>	<i>Phaeodactylum</i> <i>trycornutum</i>	<i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i>
Xylosa (%)	27	7.0	-	7.0	7.5	1.0
Manosa (%)	15	9.3	2.3	16.8	45.9	4.5
Glucosa (%)	47	54.4	74.9	32.6	21.0	85.3
Galactosa (%)	9	-	4.5	18.4	8.9	1.1
Ramnosa (%)	-	22.3	1.5	7.7	8.6	5.5
Referencia	Harun, 2011	Shekharam <i>et al.</i> , 1987	Choi <i>et al.</i> , 2010	Brown, 1991	Brown, 1991	Brown, 1991

1.3.3 Polisacáridos

Los polisacáridos de algas representan una clase de compuestos de alto valor con aplicaciones en alimentos, cosméticos, textiles, estabilizantes, emulsionantes, lubricantes, agentes espesantes y drogas de uso clínico (Arad y Levy-Ontman, 2010).

En particular, los polisacáridos sulfatados (fucoidan, carragenanos y agarans) están ganando atención por sus aplicaciones médicas como antioxidantes, antitumorales, anticoagulantes, agentes anti-inflamatorios, antivirales e inmunomoduladores (**Tabla 1.3**) (Chen et al., 2010; Guzmán et al., 2003; Kim et al., 2012; Mohamed, 2008). Aunque el mecanismo farmacéutico de los polisacáridos de algas está todavía bajo investigación, sus efectos terapéuticos se basan en la estimulación y modulación de macrófagos.

Tabla 1.3. Función farmacológica de algunas microalgas. (Adaptado de Yen et al., 2012).

Microalga	Extracto del polisacárido	Uso farmacológico	Referencia
<i>C. vulgaris</i>	Polisacárido crudo	Antioxidante	Mohamed, 2008
<i>S. quacricauda</i>	Polisacárido crudo	Antioxidante	Mohamed, 2008
<i>G. impudium KG-03</i>	Polisacárido sulfatado	Antiviral	Kim et al., 2012
<i>R. reticulata</i>	Polisacárido extracelular	Antioxidante	Chen et al., 2010
<i>C. stigmatophora</i>	Polisacárido crudo	Antiinflamatorio/ inmunomodulador	Guzmán et al., 2003
<i>P. trocornutum</i>	Polisacárido crudo	Antiinflamatorio/ inmunomodulador	Guzmán et al., 2003

Además, las microalgas ricas en carbohidratos pueden ser una buena fuente de materia prima para la producción de biocombustibles y la generación de productos de alto valor agregado, pero aún hace falta el estudio de las estrategias de obtención de estos productos, además de integrarlas en la producción de otros compuestos como lo son las proteínas y los pigmentos.

1.3.4 Proteínas y aminoácidos

El alto contenido de proteína de varias especies de microalgas es una de las principales razones para considerar estos organismos como una fuente de este tipo de nutriente, sin embargo, esto se basa en estimaciones de la llamada proteína cruda, comúnmente utilizada en la evaluación de alimentos y piensos. Sin embargo, la proteína puede fraccionarse en una parte soluble en agua del 20 % (p.e. Rubisco) y la fracción insoluble en agua que corresponde al 80%. Tomando en cuenta esto, cada una de estas fracciones puede tener diferente valor (Wang et al., 2021, Wijffels et al., 2010).

La calidad nutricional de una proteína está determinada básicamente por el contenido, la proporción y la disponibilidad de sus aminoácidos. En la **Tabla 1.4** se muestra el perfil de aminoácidos de diversas algas y se comparan con algunos alimentos convencionales y un patrón de referencia de una proteína bien balanceada (OMS / FAO, 1973). Se puede observar que el patrón de aminoácidos de casi todas las algas es favorable comparándola con la de referencia y la de alimentos (Becker, 2004, Wang et al., 2021).

Tabla 1.4. Perfil de aminoácidos de diferentes tipos de algas, en comparación con las fuentes de proteínas convencionales y la FAO / OMS (1973) patrón de referencia (g por 100 proteínas).

Fuente	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	Cys	Try	Thr	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Pro	Ser
WHO/FHO	4.0	7.0	5.0	5.5		6.0		3.5	1.0									
Huevo	6.6	8.8	7.2	5.3	5.8	4.2	3.2	2.3	1.7	5.0	---	6.2	11.0	12.6	4.2	2.4	4.2	6.9
Soja	5.3	7.7	5.3	6.4	5.0	3.7	1.3	1.9	1.4	4.0	5.0	7.4	1.3	19.0	4.5	2.6	5.3	5.8
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.8	8.8	5.5	8.4	5.0	3.4	2.2	1.4	2.1	4.8	7.9	6.4	9.0	11.6	5.8	2.0	4.8	4.1
<i>Dunaliella dardawill</i>	4.2	11.0	5.8	7.0	5.8	3.7	2.3	1.2	0.7	5.4	7.3	7.3	10.4	12.7	5.5	1.8	3.3	4.6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.6	7.3	6.0	5.6	4.8	3.2	1.5	0.6	0.3	5.1	9.0	9.0	8.4	10.7	7.1	2.1	3.9	3.8
<i>Arthospira máxima</i>	6.0	8.0	6.5	4.6	4.9	3.9	1.4	0.4	1.4	4.6	6.8	6.8	8.6	12.6	4.8	1.8	3.9	4.2
<i>Spirulina platensis</i>	6.7	9.8	7.1	4.8	5.3	2.3	2.5	0.9	0.3	6.2	9.5	9.5	11.8	10.3	5.7	2.2	4.2	5.1
<i>Aphanizomenon sp.</i>	2.9	5.2	3.2	3.5	2.5	---	0.7	0.2	0.7	3.3	4.7	4.7	4.7	7.8	2.9	0.9	2.9	2.9

1.3.5 Pigmentos

La aparición de colores de las algas se deriva de sus pigmentos que absorben la luz visible e inician las reacciones de fotosíntesis. Las tres clases principales de pigmentos fotosintéticos que aparecen en las algas son clorofilas, carotenoides y ficobilinas. La clorofila *a* es el pigmento principal en todos los organismos fotosintéticos, y absorbe energía de las longitudes de onda de la luz azul-violeta y rojo-naranja que luego sirve como un donador de electrones primario en la cadena de transporte de electrones. Otros pigmentos que generan las microalgas incluyen clorofila *b* (también *c* y *d* en diferentes tipos de algas), carotenoides (como β -caroteno en la mayoría de las algas) y ficobilinas (en cianobacterias y algas rojas (Kannaujiya et al., 2017, Patel et al., 2022, Hall y Rao, 1999) que tienen usos como alimento, colorantes y en medicina como antioxidantes, anticancerígenos y para tratamientos fotodinámica aprovechando su capacidad fotosensibilizadora (Ferruzi y Blakeslee , 2007; Busch et al., 2009). La luteína ha surgido como un pigmento de gran interés biotecnológico. Actualmente la producción de luteína es realizada a partir del cultivo de *Tagetes erecta* en México conocida como flor de cempasúchil. Por lo que, las microalgas surgen como una alternativa sostenible y económica en la producción de luteína, debido a su alta tasa de crecimiento y rendimiento. Mientras la flor de cempasúchil genera aproximadamente 120 kg de luteína por hectárea, las microalgas pueden alcanzar entre 350 y 370 kg en un área similar, esto representa una ventaja significativa en términos de eficiencia (Lin et al., 2015). Además, la capacidad de utilizar diferentes sistemas de cultivo, utilizar corrientes de desecho (gases de combustión), y la escalabilidad de los procesos de separación y extracción, las posicionan como una opción viable para la industria (Iwamoto et al., 2024).

Con lo mencionado anteriormente, se puede dar una idea del gran potencial que tienen las microalgas para la generación de una serie de compuestos de alto valor agregado. Por lo que el cultivo de microalgas destinado para la generación de biodiesel, compuestos químicos, alimenticios o farmacéuticos puede coadyuvar a lograr un proceso sostenible y económicamente viable (Wang et al., 2023, Wijffels et al, 2010).

1.4 Producción y tratamiento de biomasa microalgal

1.4.1 Sistemas de producción y condiciones para obtención de productos de interés

Los sistemas cultivo principales son: los sistemas abiertos que incluyen: i) los “raceway pond” o estanques abiertos tipo circuito que tienen un bajo costo de construcción y mantenimiento, con una baja productividad volumétrica y algunos parámetros que no pueden ser totalmente controlados como son la temperatura, la evaporación y la contaminación; por otro lado se encuentran ii) los sistemas cerrados que incluyen los fotobiorreactores tubulares horizontales, las columnas de burbujeo y los panel plano “flat panel”; que tienen alta productividad volumétrica (13 veces mayor que en los sistemas abiertos), bajo nivel de contaminación, bajo índice de evaporación y mayor control en los parámetros de operación; sin embargo, los costos de construcción y de energía que se introduce al sistema (electricidad, agua, aire), cuando se operan, son muy altos (Abdur Razzak et al., 2024; Clagnan et al., 2023). Por lo que, para reducirlos se ha buscado operar estos sistemas a la intemperie y para lograrlo se requiere de microalgas que puedan desarrollarse en los medios y condiciones de cultivo bajo rangos amplios de intensidad de luz y temperatura y que además contengan niveles aceptables de los productos de interés. Otra configuración propuesta es los sistemas híbridos que han surgido como una alternativa económica para la producción de biomasa, y consisten en una etapa inicial de producción de biomasa en fotobiorreactores cerrados, en la cual los microorganismos son mantenidos bajo condiciones de suficiencia de nutrientes etapa que es seguida por una fase de acumulación de producto (lípidos) en estanques abiertos, inducida por la deficiencia de nutrientes (Schenk et al., 2008). Después de la producción deben implementarse métodos de recuperación de la biomasa, para su posterior transformación en diversos productos.

1.5 Biorrefinerías

El concepto de biorrefinería ha sido definido como un sistema o instalación donde se convierte la biomasa un espectro de productos comercializables y energía (IEA Bioenergy, 2022) donde se busca el aprovechamiento integral de la biomasa de forma sostenible. Este concepto puede extenderse a operaciones que integren procesos para la transformación de la biomasa y su fraccionamiento en combustibles, productos químicos y energía (Cherubini, 2010).

Existen diferentes esquemas de procesamiento de biomasa que permiten la obtención de biocombustibles. Hay tres rutas básicas para que se lleve a cabo la conversión y son: 1) la gasificación de biomasa a gas de síntesis ($\text{CO} + \text{H}_2$) y una mayor conversión de gas de síntesis a los combustibles líquidos, 2) la pirólisis de la biomasa que es la despolimerización térmica de la biomasa a temperaturas moderadas en la ausencia de oxígeno añadido, la biomasa se convierte inicialmente a una mezcla de líquido (aceite de pirólisis), sólido (carbón vegetal), y las fracciones gaseosas que pueden ser utilizados en la producción de combustibles y productos químicos, y 3) la hidrólisis de biomasa en azúcar y unidades de monómero de lignina para la conversión a productos específicos (fermentación), como el biogás, biometano y biohidrógeno.

Algunas operaciones de refinería petroquímica tradicionales, tales como el craqueo catalítico y de hidroprocesamiento (HP) pueden ser aplicadas con modificaciones a las materias primas biológicas, tales como bio-aceites y triglicéridos para producir combustibles como el diésel. El craqueo catalítico del fluido (FCC) análogamente puede ser visto como pirólisis continua ($400 + ^\circ \text{C}$) a presión atmosférica en presencia de un catalizador ácido heterogéneo y se utiliza para producir gasolina. Durante la FCC, los hidrocarburos de cadena larga se fraccionan en moléculas más pequeñas, la mayoría de los cuales caen dentro del rango de ebullición de la gasolina. Las reacciones proteolíticas, deshidrogenación, descarboxilación, descarbonilación, escisión, ciclación, oligomerización, coquización, y de transferencia de hidruro se pueden producir durante el craqueo FCC en paralelo y de forma consecutiva (Al-sabawi et al., 2012).

Bajo este esquema las biorrefinerías combinan las tecnologías necesarias para fraccionar e hidrolizar materias primas biológicas con pasos de conversión para producir y recuperar productos intermedios y productos finales.

En el caso de las microalgas las principales áreas que se abordan en un esquema de biorrefinería son la producción de la biomasa, la recuperación, el suministro de energía, la integración y optimización de los procesos de fraccionamiento y obtención de los diferentes metabolitos que requieren una separación selectiva y posterior purificación de los extractos crudos (Molina et al., 2003; Wijffels et al., 2010).

Con lo mencionado anteriormente se debe profundizar en el estudio y desarrollo de tecnologías de producción, separación y transformación de la biomasa para la generación de biocombustibles de tercera generación.

1.6 Análisis tecno-económico

En los últimos años, la investigación científica relacionada con las microalgas ha aumentado considerablemente en distintos campos. Sin embargo, su implementación a escala comercial sigue siendo limitada. La viabilidad a largo plazo de las biorrefinerías actuales se ve comprometida por los altos costos de los biocombustibles y bioproductos obtenidos a partir de algas. Por ello, es necesario avanzar en áreas clave como el mejoramiento de los procesos de cultivo y procesamiento de algas, la optimización del uso energético y el análisis de costos en biorrefinerías basadas en microalgas (Yadav et al., 2022).

El uso de microalgas para la producción de biodiesel es un enfoque futurista en el escenario energético a nivel mundial. Sin embargo, los estudios y desarrollos tecnológicos relacionados con las microalgas deben analizar los bioproductos derivados y los costos de los procesos de obtención para su comercialización. La síntesis simultánea de bioproductos de valor agregado durante la producción de biocombustibles es uno de los métodos más rentables y viables para disminuir los costos de producción (Sharma et al., 2022).

Kuppens et al., (2015), define al Análisis Tecno-Económico (ATE), como una evaluación de la viabilidad económica de una nueva tecnología que busca mejorar el impacto social y/o ambiental, y que ayuda a los responsables de la toma de decisiones a orientar la investigación, el desarrollo o las inversiones. El ATE crea un análisis integral entre los aspectos técnicos y económicos bajo un enfoque de biorrefinería a partir de microalgas actualmente es un proceso iterativo que se puede dividir en una serie de pasos. En primer lugar, se debe definir un diseño preliminar del proceso y traducirlo en balances de masa y energía. En segundo lugar, esta información debe integrarse en un modelo que permita estimar los costos de inversión y operación, así como los ingresos. Luego, estos datos se utilizan para calcular los flujos de caja descontados proyectados, lo que permite obtener una primera idea sobre la rentabilidad del proceso. A continuación, se lleva a cabo un análisis de riesgos con el fin de identificar posibles barreras tecnológicas y no tecnológicas. Los resultados del análisis de riesgos se utilizan para formular estrategias de mitigación. Para cada una de estas estrategias, todos los pasos pueden repetirse. Finalmente se calcula el Valor Presente Neto (VPN), Tasa Mínima de Rendimiento (TMAR), el Periodo Cumplimiento de las Expectativas del Inversionistas (PRI) y la Tasa Interna de Retorno (TIR), que representan los cuatro indicadores financieros que ayudan a evaluar la inversión del proyecto.

El modelo de ATE puede realizarse en Excel, no obstante, los datos provenientes de softwares especializados en diseño de procesos como Aspen Plus (E.U.A), Chem Cad (E.U.A), Unisim (E.U.A), SuperPro Designer (Canadá), actualmente son considerados más relevantes (Kasani et al., 2022).

Por lo anterior, es fundamental la valorización de la biomasa algal para su aplicación en productos de alto valor, promoviendo un enfoque sostenible y económicamente competitivo. Además, se deben evaluar las industrias actuales, las políticas, las tendencias en la transferencia tecnológica, los principales desafíos y las perspectivas económicas a futuro.

1.7 Antecedentes directos

Dentro del grupo de trabajo de la UAM-C se aisló una microalga proveniente de laguna Churince (26°50'25"N; 102°08'02"O) localizada a 19.5 Km al suroeste de Cuatro Ciénegas. Ella se identificó como *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM y fue estudiada para la fijación de CO₂ en dos tipos de fotobiorreactores “airlift” y columna de burbujeo. Esta microalga presentó una tasa de fijación de CO₂ de 0.95 Kg CO₂ m⁻³ d⁻¹ y se determinó que el contenido total de aceites es entre el 20-30% de su peso seco. Otra característica interesante es que *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM no se ve inhibida por concentraciones altas de CO₂. Los parámetros cinéticos de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM son superiores a una de las principales microalgas oleaginosas reportada que es *Neochloris oleoabundans* (Chisti, 2007) y tiene una tasa de fijación que se encuentra dentro de lo aceptable según Wang *et al.*, 2006. Además, se obtuvo una productividad de 0.5 Kg_{biomasa} m⁻³ d⁻¹, y se alcanzaron concentraciones de biomasa de alrededor de 6 Kg m⁻³.

En otro estudio se probó la capacidad de acumulación de lípidos bajo diferentes condiciones de cultivo y bajo diferentes concentraciones de la fuente de nitrógeno y se realizó una caracterización del perfil de ácidos grasos. Obteniendo que *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM puede acumular el 55.7% de lípidos no polares con respecto a su peso seco, cuando es cultivada con una alimentación de 5% de CO₂ y una intensidad de luminosa de 54.7 μmol m⁻² s⁻¹, bajo condiciones de limitación de nitrógeno. También se obtuvo un perfil de ácidos grasos que incluye C16:0, C18:0, C18:1n9t, C18:1n9c, C18:3n6, con una productividad de 200 mg lípidos m⁻³ d⁻¹. Por lo que esta microalga tiene un gran potencial para la producción de lípidos (Toledo et al., 2013).

Scenedesmus obtusiusculus AT-UAM también ha sido cultivada a la intemperie sin control de temperatura y bajo un ciclo de luz circadiano, en diferentes estaciones del año. Estas pruebas se realizaron en un fotobioreactor “air-lift” de lazo extendido de 34.5 L al que se le alimentaba un flujo de aire de 5 L min⁻¹ con una concentración de CO₂ al 1%. Los experimentos mostraron que *S. obtusiusculus* AT-UAM crecía en todas las estaciones del año, bajo condiciones de variación de temperatura con rangos de 1°C (invierno) hasta 47 °C (primavera), siendo sus rendimientos de 2.56, 5.2, 3.31, 3.54 kg m⁻³ en invierno, primavera, verano y otoño respectivamente. El cultivo de esta microalga también se ha realizado en semi-continuo y en continuo siendo en primavera donde se presentaron las mayores productividades siendo de 0.62 y 0.73 Kg m⁻³ d⁻¹, respectivamente. En este sistema *S. obtusiusculus* AT-UAM logró acumular hasta un 29% de lípidos con respecto a su peso seco bajo condiciones de limitación y presentó el siguiente perfil de ácidos grasos C10:0, C16:0, C18:1n9, 18:2n6c, C18:0, C16:1, C18:3n3. (Sánchez, 2013).

Capítulo 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos

2.1 Justificación

La producción simultánea de productos de alto valor agregado bajo el concepto de biorrefinería puede contribuir a la viabilidad económica del uso de las microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles. Distintos compuestos bioquímicos de las microalgas como pigmentos (β -carotenos, astaxantina, ficobiliproteínas, etc.) ácidos grasos (γ -ácido linoléico, ácido eicosapentanoico, ácido araquidónico, etc.) vitaminas y aminoácidos esenciales pueden ser aplicados en la nutrición humana y animal, en el sector farmacéutico, cosmético y la acuicultura. Dentro de las microalgas del género *Scenedesmus* se han reportado la obtención de diversos productos como son luteína (*S. almeriensis*), L- aminoácidos y aminoácidos (*S. almeriensis* y *S. obliquus*), polisacáridos (*S. quadricauda*), carbohidratos (*S. obliquus* CNW-N), lípidos (*S. obtusiusculus* y *Scenedesmus* sp.) y el género es comúnmente encontrado en el tratamiento de aguas residuales (*S. quadricauda*). Sin embargo, se requiere más información sobre la composición de la biomasa microalgal, con el fin de evaluar, si es posible estandarizar y optimizar los usos de la biomasa y las técnicas de separación de los principales bioproductos.

En este trabajo se desea estudiar y caracterizar los compuestos bioquímicos de interés comercial como los lípidos y luteína, con el fin de establecer una estrategia de separación secuencial. El desarrollo de procesos integrados permite incrementar la viabilidad económica de los proyectos basados en microalgas como materia prima para la obtención de biocombustibles y compuestos de valor agregado que permita plantear un esquema de biorrefinería de microalgas.

2.2 Hipótesis

La evaluación de la producción de lípidos y luteína en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en condiciones de cultivo de laboratorio y a la intemperie, junto con el escalamiento de este proceso en diferentes sistemas, nos permitirá establecer estrategias de recuperación de la biomasa, esta información dará las bases para un Análisis Tecno-Económico que ayude a demostrar la viabilidad de la cepa para su integración a un modelo de biorrefinería de microalgas.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Determinar el potencial de utilizar la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT UAM en un esquema de biorrefinería para producir lípidos y pigmentos a través de la definición de estrategias para su acumulación.

2.3.2 Objetivos particulares

- Evaluar estrategias para la promover la acumulación de lípidos en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM y comparar su desempeño en sistemas operados a nivel laboratorio y en la intemperie.
- Evaluar diferentes fuentes de nitrógeno para mejorar la producción de luteína y comprara técnicas de ruptura celular para maximizar la eficiencia de extracción del pigmento.
- Evaluar el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en sistemas a escala piloto utilizando medio de cultivo alternativo y corrientes de gases de combustión.
- Realizar un análisis tecno-económico basado en el esquema de separación bajo el concepto de biorrefinería, para la evaluación de costos, consumo energético y rentabilidad económica en la producción de lípidos y luteína.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1 Diagrama de flujo

Para llevar a cabo los objetivos planteados, la estrategia experimental se desarrolló de la siguiente manera (**Figura 3.1**):

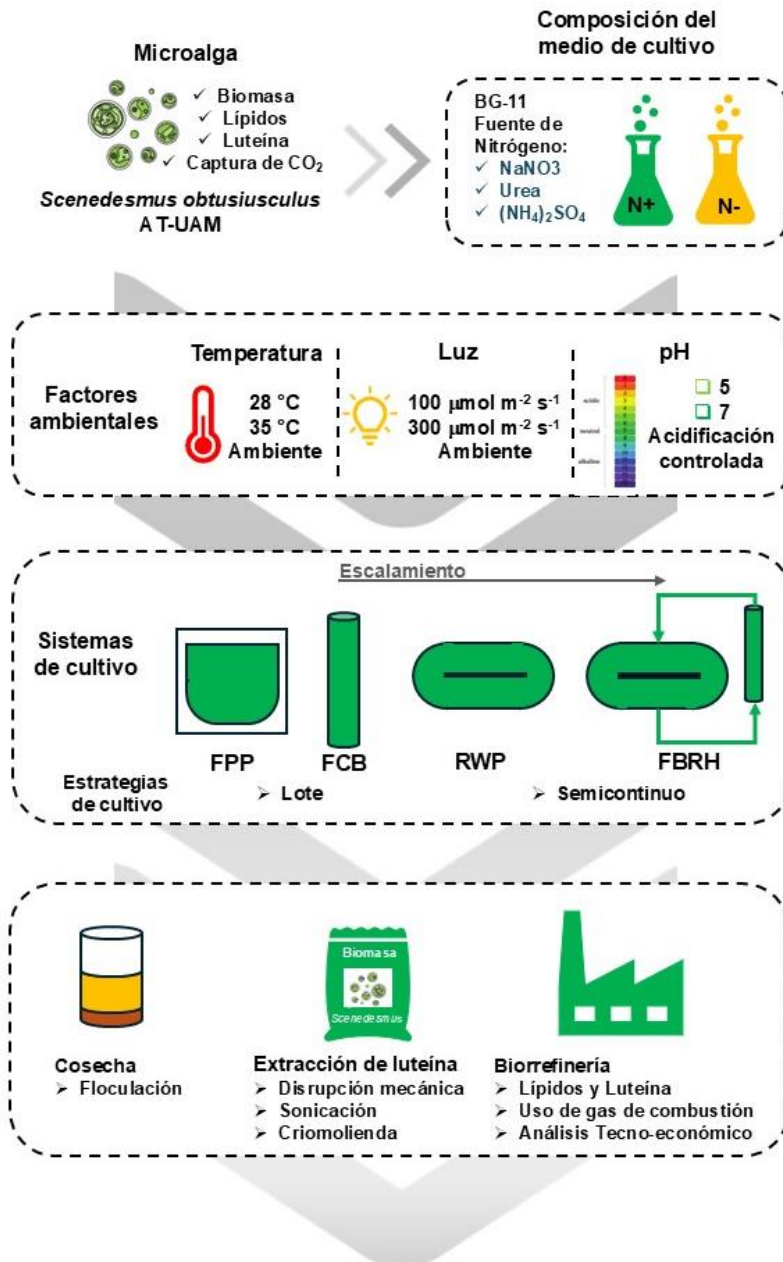


Figura 3.1. Estrategia experimental.

3.2 Microorganismo

En el presente estudio se utilizó la cepa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, que se aisló en la UAM-Cuajimalpa y que fue colectada de la laguna de Churinche (26°50'25" N; 102°08'02" O) localizada a 19.5 Km al suroeste de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Toledo-Cervantes et al., 2018).

3.3 Propagación y medio de cultivo

El medio que se utilizó para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM fue el BG-11, estéril y a pH 7.5. Las concentraciones de los compuestos requeridos para la preparación del medio se indican en la **Tabla 3.1**.

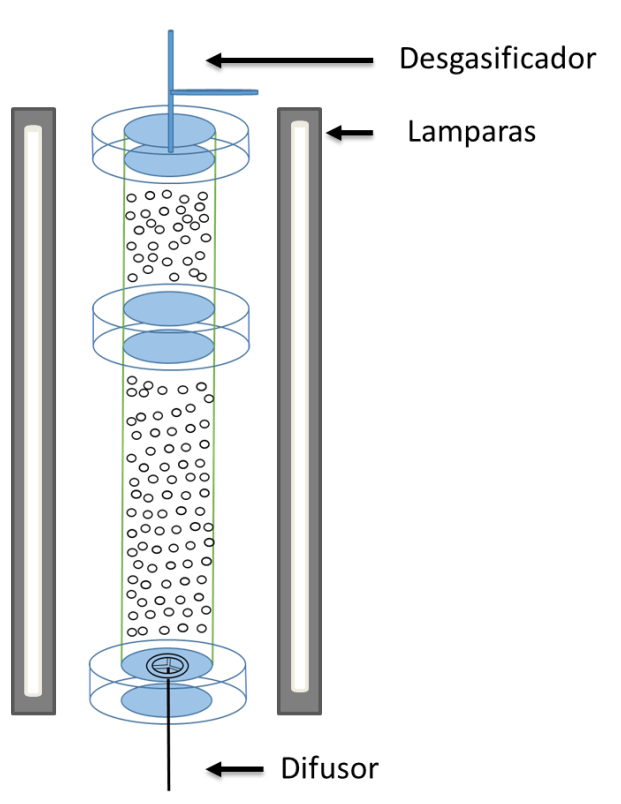
Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo BG11.

Medio de cultivo BG-11			
NaNO₃	1.5 g L ⁻¹	Metales traza A5+Co	
K₂HPO₄ 2H₂O	0.04 g L ⁻¹	H₃BO₃	2.86 g
MgSO₄ 7H₂O	0.075 g L ⁻¹	MnCl₂ 4H₂O	1.81 g
EDTA disódico de magnesio	0.001 g L ⁻¹	ZnSO₄ 7H₂O	0.222 g
CaCl₂ 2H₂O	0.036 g L ⁻¹	NaMoO₄ 2H₂O	0.39 g
Ácido cítrico	0.006 g L ⁻¹	CuSO₄ 5H₂O	0.079 g
Citrato de amonio férrico	0.006 g L ⁻¹	Co(NO₃)₂ 6H₂O	49.4 mg
Na₂CO₃	0.02 g L ⁻¹	Agua destilada	1.0 L
Metales traza A5+Co	1 mL		

Los inóculos se propagaron en un fotobiorreactor de columna de burbujeo (FCB) de vidrio, con un volumen de operación de 2.5 L, colocado dentro una cámara que cuenta con 16 lámparas de luz de día de 40 W, a una temperatura de incubación de 30°C, con iluminación constante de 8000 lx. Con los parámetros de operación indicados en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Parámetros de operación de FCB

Parámetros de operación de FBRCB	
Diámetro	6.15 cm
Volumen de operación	2.5 L
Intensidad de luz	8000 lx
Altura	1.2 m
Flujo de aireación	2 L min ⁻¹
Área iluminada	0.232 m ²
Temperatura	30°C
Flujo de CO₂	2 %



3.4 Sistemas de cultivo

3.4.1 Fotobiorreactor de Placas Planas (FPP)

El FPP fue diseñado y construido con acrílico, con las siguientes dimensiones 0.30 m de largo, 0.30 m de alto y con un camino óptico (grosor) de 0.025m con un volumen de operación de 2 L. La fase gaseosa fue distribuida desde el fondo del sistema a través de un difusor de acero inoxidable. El pH fue registrado con un sensor electroquímico (AppliedSens, USA). La temperatura del sistema fue controlada con el uso de un intercambiador de calor interno. La luz fue suministrada por dos paneles de LEDs que iluminaban ambos lados del FPP. El registro de los datos captados por los sensores se realizó utilizando una tarjeta NI-DAQ 9201 National Instruments con la que se captaban los datos utilizando el Software LABVIEW (**Figura 3.2**).

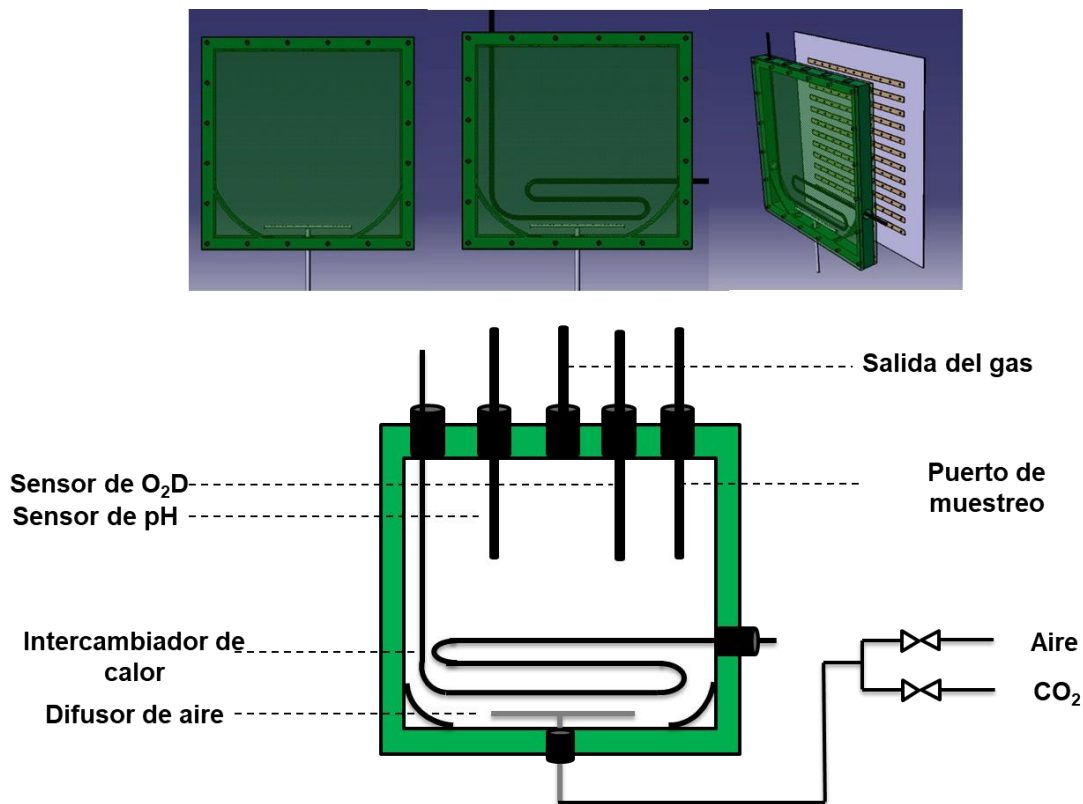


Figura 3.2. Fotobiorreactor de Placas Planas.

3.4.2 Fotobiorreactor de columna de burbujeo (CB)

El fotobiorreactor de columna de burbujeo (CB se construyó de acrílico, con un volumen de trabajo de 25 L con las siguientes dimensiones 1.80 m de alto con un diámetro de 0.145 m. La fase gas fue distribuida desde la base del sistema mediante un difusor de acero inoxidable que contaba con 60 perforaciones de 0.56 mm (**Figura 3.3**). La alimentación de la fase gas se realizó con una mezcla de aire y CO₂, este último solo se alimentaba únicamente durante el día. El sistema contaba con un sensor electroquímico (27003-20, Col-Parmer, USA) para registrar el pH y un sensor polarográfico (SN-29020-10, Cole-Palmer, USA) para el registro del oxígeno disuelto (DO). El registro de los datos de los sensores se realizó utilizando una tarjeta NI-DAQ 9201 National Instruments con la que se captaban los datos utilizando el Software LABVIEW.

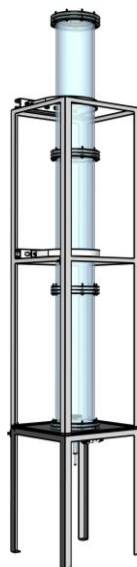


Figura 3.3. Fotobiorreactor de Columna de Burbujeo.

3.4.3 Estanque tipo circuito ó Raceway pond (120 L)

El sistema abierto Raceway pond (RWP), fue construido de fibra de vidrio con un volumen de operación de 120 L con una columna de agua de 0.15 m de altura. El sistema consistió en dos canales de 2 m de longitud y 0.22 m de ancho, conectados mediante dos curvas de 180° al final de cada canal para obtener una superficie total de 0.9 m². El mezclado del medio de cultivo fue realizado por 4 paletas impulsadas por un motor de 1/10 HP (Small motor, USA) a una velocidad lineal de 0.3 m s⁻¹ (**Figura 3.4**).



Figura 3.4. Raceway pond 120L.

3.4.4 Estanque tipo circuito ó Raceway pond (950 L)

Las condiciones del sistema se describen en la **Tabla 3.3**, el sistema se construyó de fibra de vidrio y fue impulsado por un motor de 1 hp de potencia que cuenta con un regulador de la velocidad de agitación (**Figura 3.5**).

Tabla 3.3 Parámetros de operación del RWP.

Volumen de trabajo	930 L
Área	6.2 m ²
Altura de la columna	0.15 m
Velocidad de agitación	30 cm s ⁻¹
Paletas	2 inox
Aireación	1 L min ⁻¹ aire
Operación	Lote, Semi-continuo
Condiciones	Intemperie

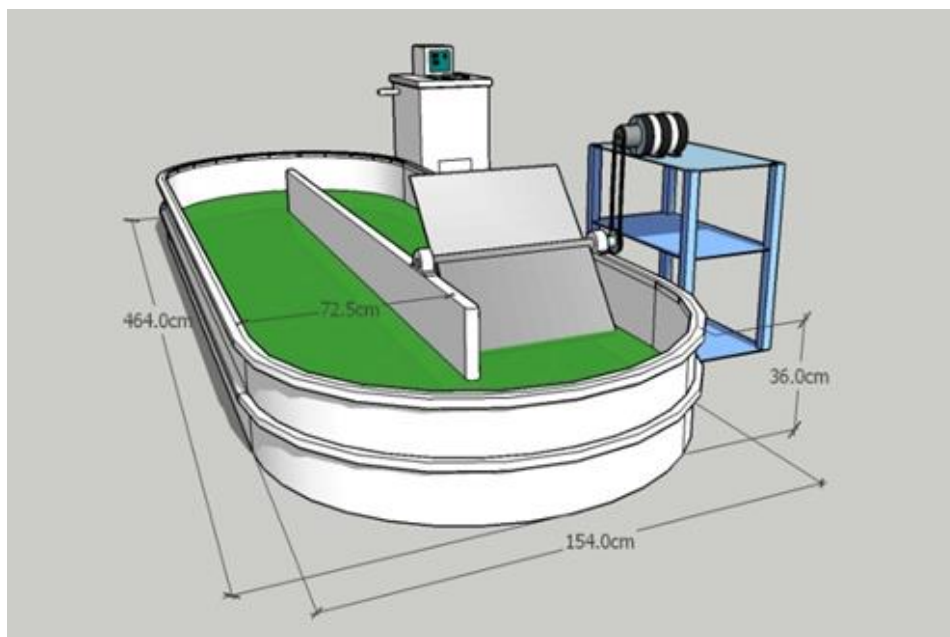


Figura 3.5. Sistema RWP 950 L.

3.4.5 Fotobiorreactor híbrido (FBRH)

El FBRH está compuesto por un sistema RWP (ver sección 3.4.3) acoplado a una columna de burbujeo (CB) (figura 7). El FBRH utiliza una bomba centrífuga que recircula el medio de cultivo del RWP a la CB a un flujo de 4.5 L min^{-1} . Las dimensiones de la CB fueron 1.8 m altura con un diámetro de 0.125 m con un volumen de operación de 18 L en donde se alimentaron las diferentes corrientes de aires y gases de combustión.

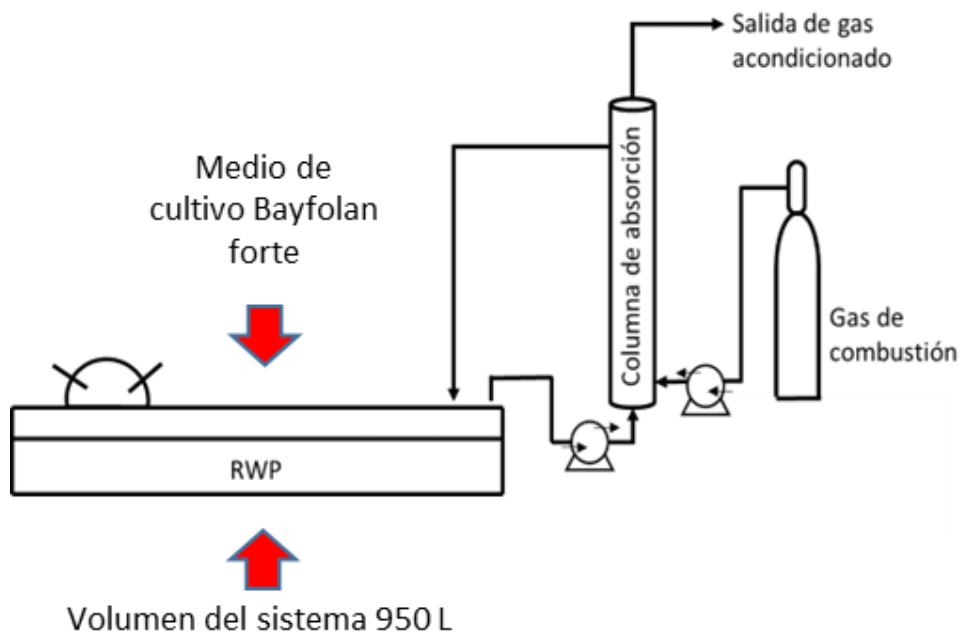


Figura 3.6. Configuración del Fotobiorreactor Híbrido.

3.4.6 Adquisición de datos temperatura y luz en sistemas a la intemperie

La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando un data logger. En el monitoreo de la temperatura del medio de cultivo y la temperatura ambiente se usó un data logger “Measurement computing USB-501-TC-LCD”. Ambos sensores se programaron para adquirir datos cada 5 minutos.

El monitoreo de la irradiación solar o escala cuántica de radiación se hizo por medio de un data logger “Dataloggin light meter DIGI-SENSE 20250-00” el cual cuantifica la irradiación de luz PAR. Fue programado para adquirir datos cada 5 minutos.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinación de biomasa por peso seco

La biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus*, AT-UAM se cuantificó por un método gravimétrico (Sánchez-García et al., 2020). Para ello se filtraron 10 mL de medio de cultivo, a través de una membrana Millipore 0.45 μm de tamaño de poro, previamente llevada a peso constante, la membrana junto con la muestra se dejó secar por un periodo de 24 horas en una estufa con una temperatura de 60°C, posteriormente se colocó en un desecador

durante 1 hora y se pesó nuevamente. El peso seco de la muestra se determinó por diferencia de peso. El filtrado se guardó para el análisis posterior de nitratos.

3.5.2 Determinación de nitratos

El filtrado reservado para la cuantificación de biomasa se utilizó para la cuantificación de nitratos. Se filtraron 5 mL a través de una membrana de acetato-celulosa de 0.2 μm de tamaño de poro. Se tomó 1 mL de la muestra, se adicionaron 2 mL de HCl 1N y se agitó con el fin de remover los carbonatos. La muestra se midió por espectrofotometría UV (Evolution 300 UV-visible) a 220 nm con una celda de cuarzo. Las concentraciones fueron calculadas a través de una curva estándar.

3.5.3 Determinación del contenido de proteínas

La cantidad de proteínas totales se determinó por medio de un método espectrofotométrico para lo que se utilizó 1 ml del medio de cultivo al cual se le adicionaron 5 mL de NaOH 0.5 M y se colocó en un baño ultrasónico durante 20 minutos. Posteriormente, se sometió a un proceso de hidrólisis alcalina a 100°C durante 20 minutos. Las muestras hidrolizadas fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 20 minutos. La cuantificación del contenido proteico en las muestras hidrolizadas se realizó con el método de Lowry *et al.*, (1951). Leyendo a una absorbancia de 750nm. Las concentraciones fueron calculadas por medio de una curva estándar de albumina bovina (Sigma-Aldrich).

3.5.4 Determinación del contenido de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos se utilizó 1 mL de medio de cultivo a la cual se le agregaron 5 mL de H₂SO₄ 1M y se colocó en un baño a 100°C durante 20 minutos, donde se llevó a cabo una hidrólisis ácida. Al término de esto se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos. La determinación del contenido de carbohidratos a partir de estos hidrolizados se realizó por el método de Fenol-Ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956) y se tomó la lectura a una absorbancia de 485 nm. Las concentraciones fueron calculadas mediante una curva estándar hecha con glucosa.

3.5.5 Determinación del contenido de clorofilas

La determinación del contenido de clorofilas se realizó utilizando 1 mL de medio de cultivo al cual se le agregaron 5 mL de metanol al 90%, la mezcla se colocó en un baño ultrasónico durante 60 minutos a 60°C donde se llevó a cabo el rompimiento celular. Después, fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se leyó a 650, 665 y 750 nm. El contenido de clorofilas en las células se cuantificó usando la ecuación:

Clorofila ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $16.5(A_{665}) - 8.3(A_{650})$ (Becker, 1994). Las absorbancias 650 y 665 fueron corregidas de la turbidez por medio de la absorbancia a 750nm.

3.5.6 Cuantificación de luteína

El contenido de luteína se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según lo descrito por (Cerón et al., 2008). Para ello, 1.5 ml de biomasa suspendida se centrifugó a $2000 \times g$ durante 5 min. El sedimento que contiene a las células se colocó en una disruptor de perlas de vidrio (mini bead beater-16, biospec products, USA) donde se agregaron 500 mg de perlas de vidrio con un diámetro de 0.5 μm durante un minuto después de este periodo se dejó enfriar, se repitió el proceso tres veces y los pigmentos se extraen con 4 ml de acetona pura. El extracto de acetona se centrifugó a $2000 \times g$ durante 5 minutos. El sedimento se re suspendió en 2 ml de acetona y se centrifugó una vez más. Este procedimiento se repitió hasta que el sobrenadante quedó incoloro. Los extractos de acetona se evaporaron bajo un flujo de nitrógeno y el residuo se volvió a disolver en 1 ml de éter etílico puro, después de lo cual se añadió 1 ml de KOH en MeOH (4 % w/v). La mezcla agitada se dejó reaccionar durante 15 minutos a 0°C en la oscuridad, bajo un flujo de nitrógeno. Para detener la reacción y para eliminar el exceso de álcali, se añadieron 2 ml de NaCl al 10 % y se agitó la mezcla. Para la separación de fases, la mezcla se centrifugó a $2000 \times g$ durante 2 minutos. La fase acuosa se retiró y se desechó. La fase de éter se lavó dos veces con 2 ml de NaCl al 10 %. A continuación, el éter se evaporó bajo un flujo de nitrógeno y el pigmento restante se re disolvió en 1 ml de acetona pura y se centrifugó para desechar partículas en el extracto. Los pigmentos se analizaron por el método cromatográfico de HPLC (Del Campo *et al.*, 2000), utilizando un HPLC Varían ProStar con detector UV/VIS. La separación se llevó a cabo en una columna de 5 μm , X Terra MSC18 (4,6 \times 150 mm). Los eluyentes que fueron utilizados fueron: (A) par de iones-agua, reactivo-metanol (01:01:08, v/v) y (B) de acetona–metanol (1:1, v/v). El reactivo de par iónico fue una solución de tetrabutilamonio (0,05 M) y acetato de amonio (1 M) en agua. Los pigmentos se eluyeron a una tasa de 1 ml min^{-1} , y fueron detectados mediante la medición de la absorbancia a 360 a 700 nm. Las concentraciones fueron calculadas mediante una curva estándar preparada con el estándar de luteína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.).

3.5.7 Cuantificación de lípidos

La cuantificación de lípidos se realizó a través del método de sulfo–fosfo–vainillina (SPV) (Mishra et al., 2014). De acuerdo con la concentración de biomasa de la muestra del cultivo

fue el volumen que se tomó (100, 200 o 300 μL). A esta muestra se le añadieron 2 mL de H_2SO_4 concentrado (98%), después de homogeneizar la muestra se colocó en un baño maría a 100 °C durante 20 min. Posteriormente se dejó enfriar en un baño de hielo por 5 minutos, seguido de esto se añadieron 5 mL del reactivo fosfo-vainillina (PV) fresco, inmediatamente se mezcló manualmente por inversión y se incubó a 37 °C por 20 min con agitación a 200 rpm y en oscuridad. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm. Las concentraciones se calcularon mediante una curva estándar.

3.5.8 Extracción y cuantificación de lípidos

La cuantificación de lípidos totales se realizó por el método de Soxhlet utilizando Hexano. La biomasa de 1L de medio de cultivo se recuperó por centrifugación y se secó en la estufa por 3 días a una temperatura de 50 °C. La biomasa seca se trituró y se extrajeron los lípidos neutros con hexano durante 8 hrs de recirculación en el equipo Soxhlet. Los lípidos extraídos se cuantificaron por diferencia de peso.

3.5.9 Identificación de los ácidos grasos

Para determinar el perfil de ácidos grasos se realizó una derivatización analítica de los lípidos. La trasmetilación del extracto, se realizó re-suspendiendo la biomasa en 1 ml de diclorometano, después se le agregaron 2 ml de una mezcla de metanol:HCl (4:1, v/v) y se calentó a 110°C durante 6 h en un digestor. Posteriormente se le agregó 1 ml de H_2O desionizada para separar las fases.

La identificación del perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases en un equipo HP-Agilent 6890, bajo las siguientes condiciones: volumen de inyección: 2 μl , gas acarreador: Helio 20 cm s^{-1} , temperatura del inyector: 250°C, split 100:1, temperatura del detector: 250°C, rampa de temperatura: temperatura inicial del horno: 140°C durante 5 min, incrementos de 1.5°C min^{-1} hasta 240°C, mantener esa temperatura por 10 min. Para la cuantificación de los FAME (Esteres Metílicos de Ácidos Grasos por sus siglas en inglés) presentes en la mezcla y se utilizó un estándar constituido de una mezcla de 36 compuestos en el rango de C4-C24.

3.5.10 Análisis elemental

La biomasa recuperada de los distintos experimentos se utilizó también para definir la composición elemental, es decir, el contenido de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre.

Las muestras se secaron y, posteriormente se pulverizaron para pesar de 2-4 μg de biomasa, se utilizó un analizador elemental (Elemental Analyzer Flash 2000, Thermo Scientific). Cabe señalar que el porcentaje relativo de oxígeno se calculó por diferencia del porcentaje relativo de CHNS. El “Higher Heating Value”, HHV por sus siglas en inglés, se refiere a la cantidad de calor liberado por unidad de masa o volumen de combustible (inicialmente a 25 °C) una vez que se quema y los productos han vuelto a una temperatura de 25 °C, incluye el calor latente de vaporización del agua, se determinó con la fórmula de Dulong:

$$HHV [MJ kg^{-1}] = 0.338 * C + 1.428 \left(H - \frac{O}{8} \right) + 0.095 * S$$

3.5.11 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La biomasa de *S. obtusiusculus* AT-UAM fue centrifugada a 2400xg y el pellet fue re-suspendido con glutaraldehído al 6% en una solución buffer de fosfatos al 100 mM, PBS, (pH 7.2) durante 2 horas a 4°C. Las células recuperadas fueron lavadas con PBS después de la centrifugación, y este proceso se repitió tres veces. Después las muestras fueron fijadas con 1% de tetraóxido de osmio. Posteriormente, se realizó un proceso de deshidratación en un cuarto de temperatura controlada, la deshidratación fue seriada iniciando con una concentración de 40% (v/v) de etanol hasta llegar al 100% con incrementos de 10%. La biomasa deshidratada fue centrifugada y fijada con resina epoxi (Epon 812, Electron Microscopy Science). Una vez que la resina se solidificó se cortaron secciones de 50-60nm utilizando un ultramicrotomo (Leica Ultracut R). Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.5%. El análisis de las muestras se realizó con un microscopio electrónico JEM-1010 (JEOL). Las imágenes se obtuvieron con una cámara modelo CCD-300-RC (MIT) y se utilizó es programa Scion Image (Scion Cooperation).

3.6 Determinación de los parámetros cinéticos de la biomasa

Los valores de biomasa medidos se usaron para construir curvas de crecimiento de biomasa *versus* tiempo, y para calcular la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) con la siguiente ecuación:

$$\mu_{max} = \frac{\text{Ln}X_t - \text{Ln}X_0}{t - t_0}$$

El tiempo de duplicación se calculó con la siguiente ecuación (Griffiths y Harrison, 2009):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

La productividad se determinó como productividad máxima (P_{max}) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P_{max} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0}$$

Donde X_0 es la concentración inicial de biomasa (g L^{-1}) al tiempo t_0 (d) y X_t es la concentración de biomasa en g L^{-1} en cualquier tiempo t (de Morais y Costa, 2007).

La tasa de fijación de CO_2 (P_{CO_2}) se evaluó como la relación entre el contenido de carbono en las células y la productividad de biomasa de las microalgas, de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$P_{CO_2} = C_c P_{max} \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right)$$

Donde M_{CO_2} es el peso molecular del CO_2 , M_C es el peso molecular del carbono y C_c es la cantidad de carbono en las células.

La tasa de dilución (D) se calculó usando la ecuación:

$$D = \frac{f}{V}$$

Donde f es la velocidad del flujo (ml min^{-1}) y V es el volumen del reactor.

La determinación de la eficiencia fotosintética se calculó utilizando el modelo planteado por (Dillschneider et al., 2013), a través de la siguiente ecuación:

$$EF = \frac{C_b V_r \Delta H_{Cb} E_N}{E_f A_R I_T}$$

Donde C_b es la concentración de biomasa generada (g L^{-1}), V_r es el volumen del fotobiorreactor (L), ΔH_{Cb} es el calor de combustión de la microalga (KJ g_b^{-1}), E_N es un coeficiente que considera la cantidad de energía lumínica que requiere la microalga para la asimilación de la fuente de nitrógeno en el material celular, se considera en un rango de

1.2-1.3 (caso base 1.25) (Williams y Laurens, 2010), E_f es el factor de conversión de luz en energía (KJ mol foton^{-1}), A_R es el área iluminada del fotobiorreactor (m^2) e I_T es la irradiancia que llega al fotobiorreactor durante un periodo determinado ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.7 Análisis Tecno-Económico

3.7.1 Parámetros y software

En este trabajo se utilizó la información experimental obtenida en los capítulos 4, 5 y 6, relacionada con la captura de CO_2 , la producción de biomasa, lípidos y luteína utilizando la cepa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM.

Para llevar a cabo la evaluación del ATE se utilizó la herramienta de simulación de bioprocesos SuperPro Designer v10®. Todo el modelo se configuró para ser simulado bajo un régimen continuo.

3.8 Análisis estadístico

Todos los datos reportados tienen su correspondiente desviación estándar, las diferencias significativas fueron analizadas utilizando la función ANOVA multivariado considerando valores de probabilidad ($p \leq 0.05$) con un nivel de confiabilidad del 95%.

Se utilizó el modelo Gompertz con un ajuste de la R^2 del 95% que fue utilizado para calcular la productividad máxima de biomasa con el Software Origin 9.

Capítulo 4. Efecto de la acidificación controlada sobre el aumento de la acumulación de lípidos en la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en condiciones controladas y en la intemperie.

4.1 Resumen

En este capítulo se explora la influencia de la acidificación controlada en la acumulación de lípidos en la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno. En este trabajo se exploró la acidificación con CO₂ y HCl en un fotobiorreactor de placas planas operado en condiciones controladas. Donde la mayor acumulación y productividad de lípidos fue de 60 %, 85 mg L⁻¹ d⁻¹ respectivamente, que fueron obtenidos cuando se aplicó una acidificación controlada a las 80 horas de operación bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Globalmente el contenido de lípidos obtenido sin acidificación en condiciones controladas y en la intemperie fue duplicado. Los análisis revelaron cambios menores en el perfil de ácidos grasos, lo que sugiere una alta especificidad de la microalga en la producción de lípidos. Sin embargo, se observaron cambios significativos en la ultraestructura de los componentes subcelulares y en la pared celular. La estrategia fue aplicada exitosamente en fotobiorreactores de columna de burbujeo y estanques tipo circuito operados en la intemperie, obteniendo rendimientos de 45% en la acumulación de lípidos en ambos sistemas.

4.2 Introducción

El cultivo de microalgas en una tecnología promisorio para realizar la fijación biológica de CO₂ y para la generación de productos con valor comercial. Dentro de los cuales, los lípidos pueden ser transformados por medio de la transesterificación para la producción sustentable de biodiesel, cuando se combina con la fijación de CO₂ y con corrientes de desecho (p. ej. gases de combustión y las aguas residuales) (Camacho and Macedo, 2019; Seyed et al., 2018). Existe un gran número de estudios centrados en la producción de lípidos a partir de microalgas donde, se demuestra la dependencia de la producción de lípidos debido a la naturaleza de la especie de microalga y a las condiciones de cultivo. Uno de los principales factores de estrés es la limitación de la fuente de nitrógeno siendo la estrategia más utilizada y estudiada para la acumulación de lípidos neutros, carbohidratos y carotenoides. Las microalgas son capaces de adaptarse a estas condiciones, pero se ven severamente afectadas y disminuidas sus capacidades fotosintéticas por la reducción en los pigmentos, proteínas fotosintéticas y los centros de reactivos de la fotosíntesis se minimizan, debido al

daño generado por la sobreexcitación (Feng et al., 2011). Los factores ambientales como lo son la temperatura, el pH y la irradiancia tienen un gran impacto sobre la productividad lipídica (León-Saiki et al., 2017), (Ras et al., 2013). El control del pH tiene una función crítica, debido a que determina la disponibilidad de CO₂ y la distribución acuosa de los diferentes iones de las especies de carbono entre otros nutrientes esenciales, además, tiene un gran impacto en el metabolismo celular (Guckert and Cooksey, 1990). Las mejores condiciones para el crecimiento de la biomasa microalgal se observan cuando el cultivo se encuentra cercano a los valores de pH neutro. Cuando se presentan valores altos de pH, los carbonatos representan la mayor proporción de especies de carbono, disminuyendo la concentración de CO₂ presente en el medio de cultivo, donde la anhidrasa carbónica (CA) y los mecanismos concentradores de CO₂ (CCM), juegan un papel muy importante en el aprovechamiento eficiente del carbono inorgánico (Sato et al., 2001). Por otro lado, las condiciones ácidas limitan el crecimiento y pueden causar inhibición del metabolismo (Azov, 1982), (Chen y Durbin, 1994). Actualmente, se ha reportado que los cambios controlados en los valores de pH tienen influencia en la capacidad de las microalgas para acumular lípidos bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno. En general los trabajos donde se reporta el uso de estas estrategias son realizados en condiciones de laboratorio a pequeña escala y han mostrado que la influencia de los cambios de pH es específica para cada especie por lo que utilizar condiciones alcalinas (Santos et al., 2014, 2013) ó ligeramente ácidas (Cabello et al., 2015, Jin et al., 2016, Mandotra et al., 2016), promueven un aumento en el rendimiento de la acumulación de lípidos.

La microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM ha sido previamente reportada como una cepa con gran potencial para la acumulación de lípidos precursores del biodiesel, alcanzando valores de hasta 55 % g_{lipidos} g_b⁻¹ bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno (Toledo-Cervantes et al., 2013, Toledo-Cervantes et al., 2018). Sin embargo, alcanza los valores más altos de actividad fotosintética cuando el valor de pH es de 5.5 (Cabello et al., 2015). Por lo anterior la cepa presenta potencial para la acumulación de lípidos evaluando estrategias de operación mediante la acidificación del medio de cultivo.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el incremento del contenido de lípidos en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno y un pH ácido. Ambas condiciones se evaluaron a nivel laboratorio (condiciones controladas) y en cultivos en la intemperie utilizando diferentes configuraciones de fotobiorreactores. Para la evaluación de la acidificación se realizaron experimentos bajo

condiciones controladas. Donde se evaluaron estrategias para la disminución del pH 1) utilizando una solución ácida y 2) la alimentación de CO₂. Además, de seleccionar el periodo de acumulación de lípidos. Posteriormente se realizó la verificación de la estrategia en fotobiorreactores de columna de burbujeo (FCB) y raceway pond (RWP) operados en la intemperie. Adicionalmente, se evaluaron los perfiles de lípidos en las diferentes condiciones. Finalmente, se utilizó microscopía de transmisión electrónica (TEM) para visualizar cambios ultraestructurales y en la pared celular relacionados con los cambios de condiciones de crecimiento a condiciones de acumulación de lípidos derivados de la limitación de nitrógeno y acidificación.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Cepa y medio de cultivo

En este trabajo se utilizó la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, cultivada en medio mineral BG-11 (véase la sección 3.3).

4.3.2 Fotobiorreactores

La **Figura 4.1** muestra las diferentes configuraciones de fotobiorreactores utilizados. Los sistemas de Placas Planas (FPP), se utilizaron para evaluar las estrategias de acumulación de lípidos en condiciones controladas. Los experimentos en condiciones externas fueron realizados en un Fotobiorreactor de Columna de Burbujeo (FCB) y en un Raceway Pond (RWP), donde se validó el efecto de la estrategia de acumulación de lípidos definida previamente en condiciones controladas.



Figura 4.1. Fotobiorreactores para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM a) Fotobiorreactor de Placas Planas (FPP), b) Fotobiorreactor de columna de burbujeo (FCB) y c) Raceway pond (RWP).

Las características y especificaciones de cada sistema están descritas en las secciones 3.4.1, 3.4.2 y 3.4.3.

4.3.3 Fotobiorreactor de Columna de Burbujeo y Raceway Pond operados en la intemperie.

Los experimentos con los sistemas FCB y RWP fueron realizados en la intemperie en los periodos de otoño e invierno en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, en la Ciudad de México (latitud: 19° 21' 41" N; y longitud: 99° 04' 22" W). Se evaluó el crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM utilizando el medio mineral BG-11 completo en la CB (0.16 g L^{-1} de biomasa inicial) y en le RWP (0.08 g L^{-1} de biomasa inicial).

4.3.4 Estrategias para la evaluación de la acidificación del medio de cultivo y la acumulación de lípidos.

4.3.4.1 Fotobiorreactor de Placas Planas operado en condiciones controladas.

Los experimentos se realizaron con biomasa previamente cultivada con medio mineral BG-11. La biomasa fue recuperada y concentrada mediante un proceso de centrifugación y lavada dos veces con agua destilada. La biomasa fue re-suspendida en medio mineral BG-11 2X que no contenía ninguna fuente de nitrógeno para alcanzar una concentración inicial de biomasa de 0.6 g L^{-1} . Los FPP fueron operados en las condiciones óptimas de acumulación de lípidos previamente reportadas por (Cabello et al., 2015), a una temperatura de $28.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las estrategias para mantener el valor de pH de 5.5 o para que se encontrara cercano a la neutralidad, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, incluyeron la aplicación de diferentes concentraciones de CO_2 o HCl (1N) en diferentes etapas del cultivo. Las respuestas fisiológicas debido a las condiciones de acidificación y limitación de nitrógeno fueron evaluadas con la composición bioquímica de la biomasa (lípidos, proteínas, carbohidratos y clorofilas), además, se realizaron observaciones con microscopía electrónica de transmisión.

4.3.4.2 Limitación de nitrógeno bajo acidificación en sistemas a la intemperie.

Los sistemas de CB fueron operados durante 10 días y se utilizó inyección de aire en mezcla con CO_2 (sección 4.2.3). Para los experimentos bajo la limitación de la fuente de nitrógeno, se utilizó biomasa previamente cultivada en condiciones controladas y esta fue recuperada como se indica en la sección 4.2.4.1. En la primera estrategia evaluada, la biomasa se mantuvo en un pH cercano al valor neutro mediante la inyección del 2% de CO_2 en mezcla con aire, para evaluar el efecto de las condiciones ambientales en la acumulación de lípidos. En la segunda estrategia, el pH se mantuvo inicialmente cercano al valor neutro, y después de que la acumulación de lípidos se mantuviera en un valor constante (aproximadamente a los 8 días), el valor del pH se fijó a 5.5 mediante la adición de HCl (1N) en el medio de cultivo.

4.3.5 Métodos analíticos

4.3.5.1 Análisis de la biomasa

La concentración de biomasa, contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofilas en la biomasa, perfil de FAMES, TEM y los nitratos disueltos en el medio de cultivo fueron evaluados de acuerdo con lo reportado en la sección 3.5.

4.3.5.2 Parámetros cinéticos

La tasa específica de crecimiento (μ , d^{-1}), la productividad de biomasa (P_b , $g L^{-1} d^{-1}$), eficiencia fotosintética (PE, %) y el rendimiento de lípidos ($g_{lip} mol_{foton}^{-1}$) fueron calculados de acuerdo con lo reportado en la sección 3.6.

4.4 Resultados

En esta sección se presentan los resultados y discusión de los diferentes estudios experimentales realizados.

4.4.1 Evaluación de la acumulación de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno y acidificación controlada en el FPP nivel laboratorio.

En la **Figura 4.2** se muestra el efecto de la inyección de CO_2 sobre el pH en condiciones de limitación de nitrógeno. En condiciones abióticas se requirieron $13.7 L_{CO_2} L_{medio}^{-1} d^{-1}$ para mantener el pH en 5.5, valor que se encuentra cercano al valor teórico reportado de $18 L_{CO_2} L_{medio}^{-1} d^{-1}$. En contraste, para mantener un valor estable de pH cercano a 6.5, en condiciones iniciales de limitación de nitrógeno, temperatura de $28^\circ C$, irradiancia de $100 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ con la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, son necesarios más de $35 L_{CO_2} L_{medio}^{-1} d^{-1}$, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de amortiguamiento del pH, mediante la liberación de grupos OH al medio (Sato et al., 2001). Controlar el pH a un valor cercano a 5.5 después de la adaptación a las condiciones de limitación, requiere aproximadamente $45 g_{CO_2} L_{medio}^{-1} d^{-1}$, que representa un valor 14 veces mayor que la máxima tasa de consumo ($3.26 g_{CO_2} L_{medio}^{-1} d^{-1}$), cuando *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM es alimentada con 5.6 % CO_2 , a pH de 6.5, en condiciones controladas en un fotobiorreactor de columna de burbujeo (Cabello et al., 2017). En este trabajo la microalga no estaba limitada por la cantidad de carbono inorgánico, debido a que el exceso de CO_2 no incremento la tasa de fijación de CO_2 . Los resultados de la acidificación en la etapa final reflejan una disminución en el mecanismo de amortiguamiento del pH. Además, la cantidad de CO_2 necesaria para poder alcanzar el valor óptimo de pH es casi tres veces mayor a lo requerido en condiciones abióticas. En general las microalgas expuestas a condiciones

ácidas muestran una tendencia a mantener valores del pH intracelular cercanos a la neutralidad.

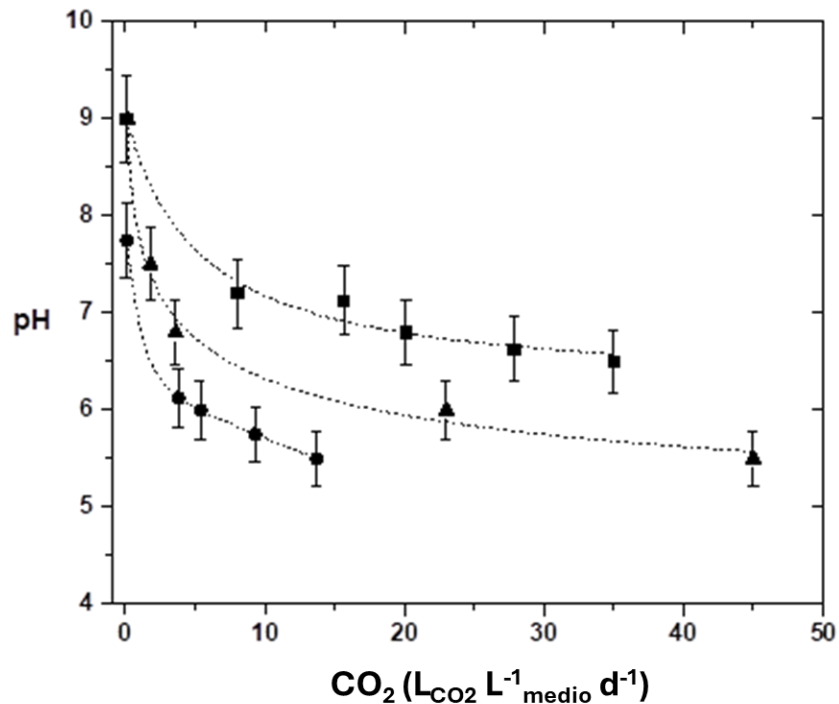


Figura 4.2. Efecto del CO₂ en el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, condiciones abióticas (●), condiciones iniciales de limitación de nitrógeno (■), condición de limitación de nitrógeno (▲).

Algunas algas que han demostrado tolerancia a las condiciones ácidas como *Chlorella* sp. (Terry y Abadía, 1986) y *Euglena mutabilis* (Gehl and Colman, 1985), tienen la capacidad de ajustar su pH intracelular en respuesta a los cambios de pH en las condiciones externas. *Chlorella saccharophila* y *Scenedesmus quadricauda* pueden crecer con valores de pH internos de 7.3 (pH citoplásmico), el cual pueden mantener incluso cuando el pH externo varía en el rango de 5 a 7, para lograr esto es necesario un alto gasto de energía para poder bombear protones desde el interior de la célula para compensar el desbalance provocado por el pH externo (Lane y Burris, 1981). *Euglena mutabilis* presenta un pH interno de 5.0 cuando las condiciones externas son ácidas (pH 3.0) y un pH interno de 8.0 cuando hay condiciones alcalinas (pH 9), lo que sugiere la presencia de un mecanismo de amortiguamiento que previene que el metabolismo de la microalga se vea afectado por las condiciones ácidas o alcalinas (Gehl and Colman, 1985). El pH tiene un efecto importante sobre la actividad fotosintética en cepas del género *Scenedesmus*, a un valor de pH 9.6

presentan una alta actividad, que disminuye cuando el pH es de 7 y se desactiva completamente a un pH menor de 4.5 o cuando el pH es mayor a 10.8 (Felföldy, 1965). Así mismo, (Meszes and Erdei, 1969) estudiaron las propiedades de la actividad de la ATPasa en *S. obtusiusculus* en rangos de pH de 4.8-8.6 y observaron diferentes máximos de actividad a 5.6, 6.4 y 7.2. Los autores sugieren la presencia de diversas enzimas o diferentes arreglos de la ATPasa que dependen del pH externo. La acidificación por medio de la solubilización del CO₂ tiene gran relevancia cuando se habla de corrientes gaseosas con alta concentración de CO₂, como lo son los gases de combustión ó biogás, los cuales pueden ser utilizados como materia prima para el cultivo de microalgas. (Tang et al., 2011), reportan que un incremento en el medio de cultivo de 0.03% a 50% (v/v) en la concentración de CO₂ resulta en una disminución del pH hasta 5.3. Por otro lado, el consumo de especies de carbono inorgánico y nitrato, provocan incrementos en los valores de pH. Sin embargo, pocos trabajos evalúan este efecto bajo condiciones de limitación de nitrógeno. (Qiu et al., 2017) estudiaron el efecto del control del pH mediante la inyección de CO₂ en el cultivo bajo condiciones de acumulación de lípidos de *Chlorella sorokiniana* en un fotobiorreactor de 90 L. Reportando que la cantidad de CO₂ requerido para mantener las mejores condiciones de crecimiento y acumulación de lípidos a pH a 6.5, tiene un costo estimado de \$200 dólares/tonelada, además de presentar una alta ineficiencia en la captura de CO₂ (13.33 gCO₂ g_{biomasa}⁻¹). Estos resultados son similares a los reportados en este trabajo cuando se utiliza la inyección de CO₂ como método de control de pH.

Alternativamente se evaluó el control del pH mediante la adición de ácido en el medio de cultivo, pero esto implica una adición continua de una solución 1N HCl. La primera inyección se realizó con 8 ml L_{medio}⁻¹ y después de 15 a 20 minutos fue necesario realizar una nueva adición, esto resultó en un aumento en el volumen de trabajo y en el contenido de sales (<0.28 gCl L_{medio}⁻¹), además de la formación de espuma debido a la liberación de CO₂ del medio de cultivo. Posteriormente, se ensayó la combinación de ambas estrategias en diferentes estadios del cultivo. La primera prueba consistió en fijar el pH inicial a 5.5 con la adición de HCl y mantener el valor con adición continua de CO₂. La **Figura 4.3a** muestra el crecimiento y la acumulación de lípidos en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en el FPP cuando fue cultivada en condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno a con un valor inicial de pH de 5.5, el cual se mantuvo durante todo el cultivo. Donde se puede observar que el contenido de carbohidratos y lípidos incrementó hasta alcanzar un 32% a las 160 horas y 46% en las primeras 40 horas respectivamente, en contraste el contenido de proteínas desciende hasta alcanzar valores finales de 13%.

En el segundo ensayo (**Figura 4.3b**), el valor de pH se mantuvo entre 6.6-7.0 por medio de la inyección de CO₂ hasta alcanzar un estado estacionario en el contenido de lípidos, donde se aplicó la acidificación controlada mediante la adición de una solución de HCl (1N). Esta condición se alcanzó a las 80 horas después del inicio del experimento donde la concentración de biomasa fue de 0.7 g L⁻¹ y un contenido de lípidos del 40% g_{lip} g_{DCW}⁻¹. Resultados similares han sido reportados por Cabello et al (2015) en condiciones de operación similares y bajo la limitación de la fuente de nitrógeno. Sin embargo, se logró la acumulación hasta alcanzar un máximo de 53% en 182 horas. En nuestro caso, el contenido de lípidos se incrementó de 40% a 60% g_{lip} g_{DCW}⁻¹ en solo 140 horas y el contenido de lípidos se duplicó en comparación con el experimento de pH constante (5.5) en el mismo periodo de tiempo. Estos valores del contenido de lípidos son mayores a los reportados por Cabello et al., (2015) (53% g_{lip} g_{DCW}⁻¹) y por (Toledo-Cervantes et al., 2013) (55.3% g_{lip} g_{DCW}⁻¹). El experimento alcanzó productividades máximas de biomasa y lipídica de 142 mg L⁻¹ d⁻¹ y 85 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. En la Figura 10b se muestra la evolución de la biomasa producida y la composición del perfil bioquímico. Se observó que las condiciones de limitación de nitrógeno favorecen la acumulación de lípidos, que alcanzó un valor máximo de 48% a las 60 horas, después de ese tiempo el valor de los carbohidratos decrece al mismo tiempo que el contenido de lípidos aumenta hasta alcanzar el 60% de lípidos con un contenido final de proteínas del 11%, carbohidratos, 25% y cenizas de 4%.

Otro efecto metabólico derivado del desbalance osmótico causado por el pH bajo es la producción de triglicéridos. Jin et al., (2016), estudió el contenido total de lípidos intracelulares bajo diferentes condiciones de pH (5.5-8.8), y reportó que el pH óptimo para la acumulación de lípidos fue de 6.5. El estudio sugiere que el estrés causado por el pH externo estimula los mecanismos de regulación interna del pH y la activación de algunas enzimas como la descarboxilasa que está asociada con la síntesis de hidrocarburos los cuales son muy sensibles a las variaciones de pH.

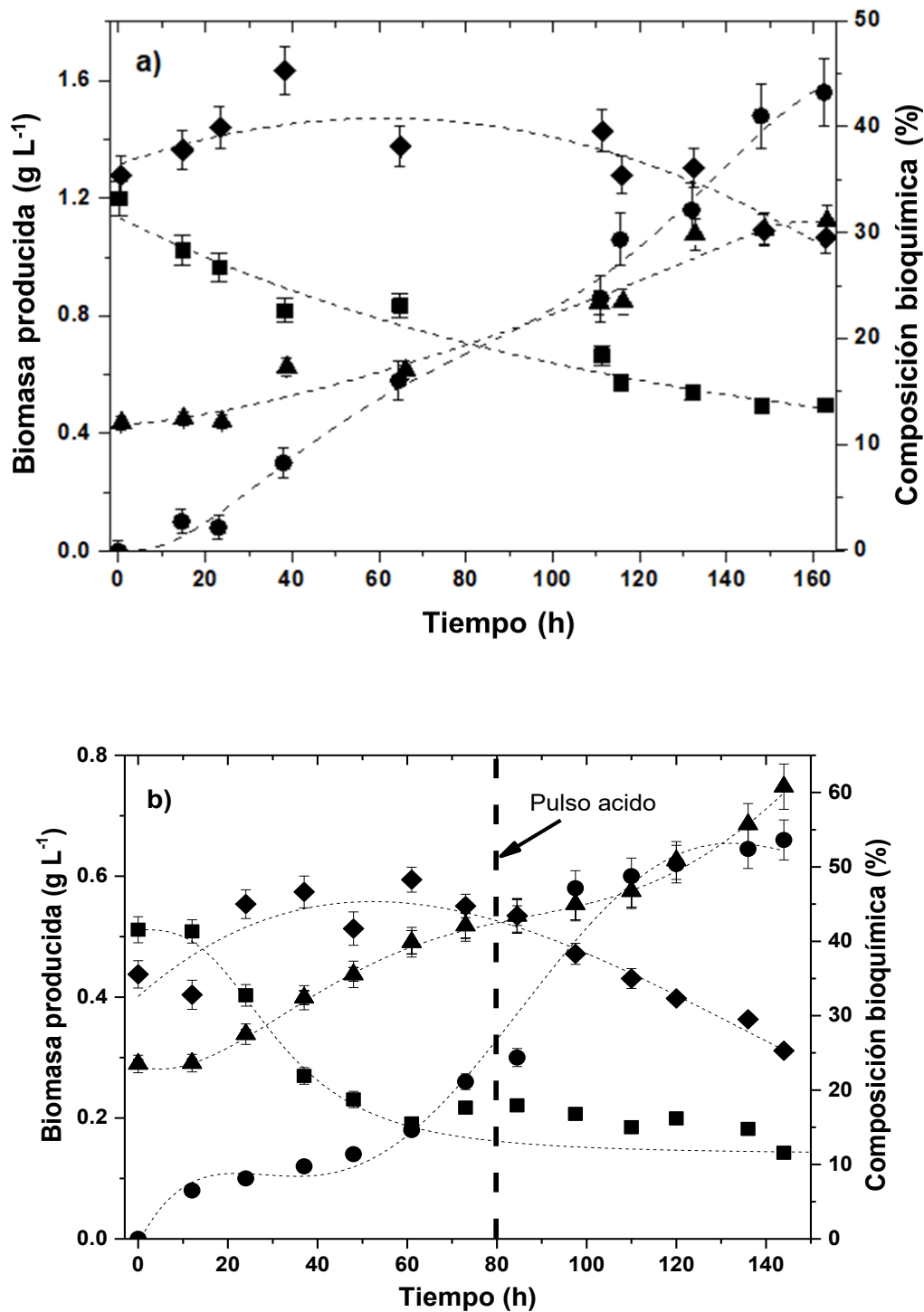


Figura 4.3. a) efecto del pH 5.5 constante en condiciones de N-limitado, b) Efecto del pulso ácido, a las 80 horas, para alcanzar un pH de 5.5 bajo condiciones de N-limitado, en el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en un fotobiorreactor de placas planas, FPP; biomasa (●), proteínas (■), carbohidratos (◆) y lípidos (▲).

El nitrógeno es uno de los principales componentes celulares y se puede encontrar en las proteínas, ácidos nucleicos, moléculas de transferencia de energía, etc. La limitación de la fuente de nitrógeno provoca una modificación en los componentes internos de la célula, en este trabajo en ambos casos y para las dos estrategias evaluadas, el contenido proteico disminuyó de 35 % hasta un 11-13%, en la etapa final del experimento (**Figura 4.3**). Un comportamiento similar ha sido reportado en el cultivo bajo condiciones de limitación de nitrógeno de las cepas *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, *Chlorella vulgaris* FSP-E, *Chlorella vulgaris* ESP-6 y *Chlorella orbicularis* Tai-04, donde el contenido proteico disminuyó de 47.75 a 16.87%, 60.38 a 21.09%, 47.78 a 22.84% y de 33.97 a 20.19%, respectivamente (Pancha et al., 2014, Yen et al., 2013). Durante la limitación de nitrógeno, los flujos de carbono cambian, y compiten en diferentes rutas que generen reservas de energía, principalmente lípidos y carbohidratos (Siaut et al., 2011). Estos pueden ser utilizados como sumideros de electrones bajo situaciones de exceso de electrones provenientes de la fotosíntesis (Hu et al., 2008). Como se puede observar en nuestro trabajo, se presenta un incremento en el contenido de carbohidratos por arriba del 48 % $g_{CHO} g_{DCW}^{-1}$ en las primeras 60 horas y posteriormente una disminución, cuando los lípidos comienzan su aumento hasta alcanzar un valor máximo de 60% $g_{lip} g_{DCW}^{-1}$ (ver **Figura 4.3b**). El rol que juegan los carbohidratos en la acumulación de lípidos aun es controversial, debido a la naturaleza de sus interacciones y de los factores que intervienen en la generación de estas dos moléculas de almacenamiento de energía. (Fan et al., 2012), reporta que en *Chlamydomonas reinhardtii* predomina la síntesis de carbohidratos sobre la síntesis de lípidos. Por lo que la acumulación de lípidos se da cuando la disponibilidad de carbono excede la capacidad de síntesis de carbohidratos. Alternativamente, los carbohidratos pueden acumularse como una respuesta inmediata al estrés por la deficiencia de nitrógeno y posteriormente ser convertidos en moléculas de almacenamiento prolongado como lo son los lípidos, lo anterior considerando que la energía de los lípidos es alrededor de 2.25 veces mayor que la de los carbohidratos (León-Saiki et al., 2017, Zhu et al., 2014).

Las micrografías de transmisión electrónica de *S. obtusiusculus* AT-UAM muestran el crecimiento en condiciones de limitación de nitrógeno (**Figura 4.4 a-c**), con los cloroplastos (C), gotas de lípidos (LD), pirenoides (P), rodeados de gránulos de almidón (S). En la **Figura 4.4 b**, se observa la estructura pared celular (CW), que está dividida en diferentes capas, que se pueden visualizar en la **Figura 4.4c** como capa de pectina (PL), una capa a base de algaenanos (tri capa, AL), capa fibrilar (FL) y la membrana celular (CM). Las **Figuras 4.4 d-f**, muestran diferentes estadios de la célula en condiciones de limitación de nitrógeno,

cuando el pH se mantuvo a 5.5 mediante la adición de CO₂ y en la **Figura 4.4 g-i** presenta la respuesta de la célula cuando se usa la acidificación controlada a las 80 horas.

La pared celular de las microalgas es la capa límite que interactúa directamente con el ambiente en el que crece y se asemeja la de las plantas superiores, tiene una estructura elástica que le ayuda a mantener la integridad mediante la combinación de fuerza mecánica y elasticidad (Yap et al., 2016). La pared celular está formada por una pared de pectina, cuyo grosor depende de la exposición a factores ambientales externos (Burczyk et al., 2014), y una capa interna que corresponde a una red microfibrilar que le confiere rigidez a la pared celular debido a su contenido de celulosa (Barsanti. & Gualtieri, 2007). Una capa fina intermedia que cuenta con una estructura trilaminar compuesta por el biopolímero algaenano. Este último está compuesto por polímeros alifáticos altamente resistentes, que a su vez tiene una alta resistencia a los ácidos y a las bases (Dunker and Wilhelm, 2018), las cepas de microalgas que no tienen algaenanos son más sensibles a una gran variedad de compuestos tóxicos. Las imágenes de TEM muestran que *S. obtusiusculus* AT-UAM tiene una capa de algaenanos (**Figura 4.4 c**). Además, se observaron cambios significativos en la ultraestructura de los componentes subcelulares y de la pared celular cuando se cultivó en diferentes condiciones. La limitación de nitrógeno indujo la degradación de los cloroplastos, que se puede observar por la reducción del tamaño y su reubicación en la periferia de la célula (**Figuras 4.4 d-f**), así como, los cambios de la fase rica en almidones (**Figuras 4.4 d, g**), a la fase rica en lípidos (**Figuras 4.4 e, h**). La microalga también presenta cambios en el grosor de la pared celular, cambiando el grosor (330 nm) después de la aplicación de la acidificación en contraste con la condición de limitación de nitrógeno (140 nm), o en condiciones de crecimiento (125 nm) (**Figuras 4.4 c, f, i**). Existen varios reportes de la acumulación de lípidos en microalgas bajo condiciones de limitación de nitrógeno, pero poca información disponible de los cambios en la pared celular, como respuesta a condiciones de estrés, como lo es, la limitación de nitrógeno o la acidificación. (Yap et al., (2016) reportaron un incremento considerable en el tamaño promedio de la pared de *Nannochloropsis* sp., y *Chlorococcum* sp., correlacionado con condiciones de limitación de nitrógeno. El estudio de la pared celular en diferentes ambientes de cultivo es extremadamente relevante en el procesamiento posterior de la biomasa microalga (D'Hondt et al., 2017).

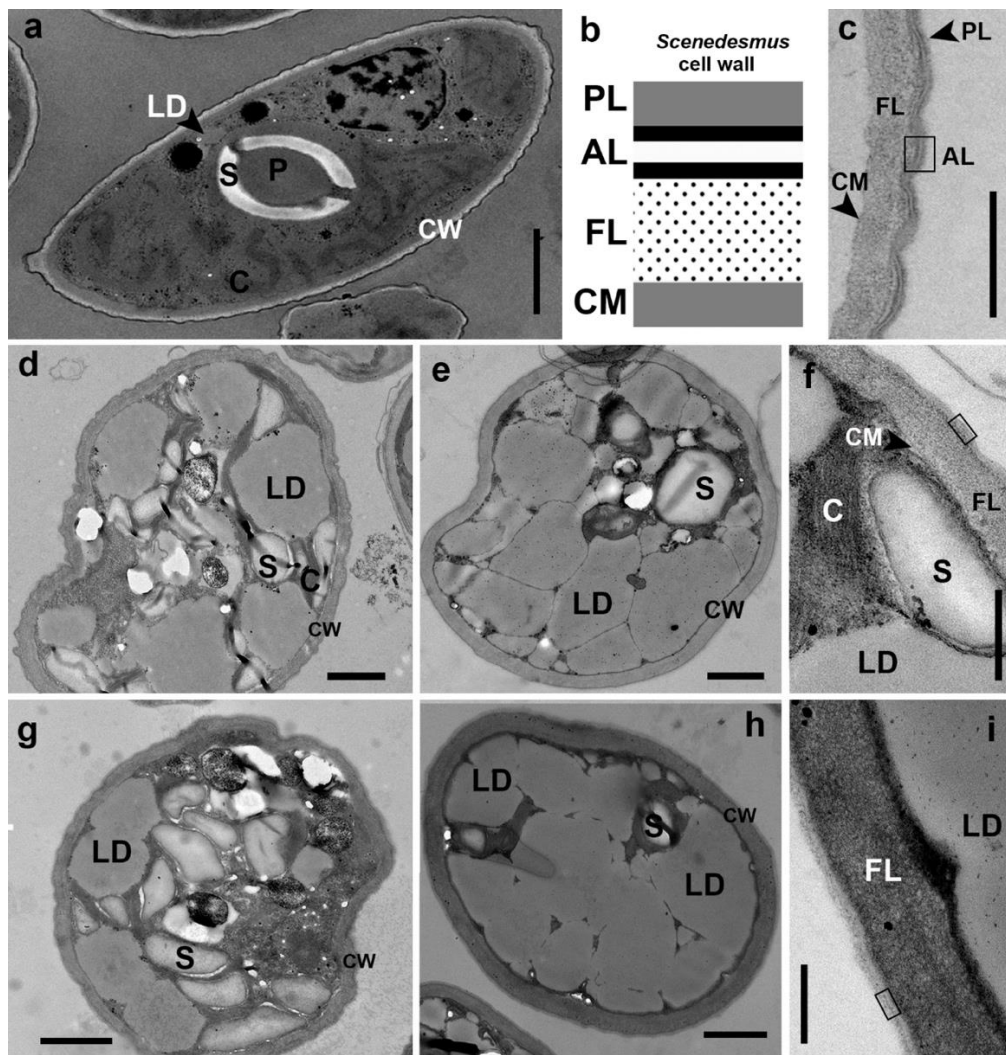


Figura 4.4. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM: a) Cepa normal bajo condiciones de crecimiento. Se observan: C = cloroplasto, P = pirenoide, S = gránulo de almidón, LD = gota lipídica; b) Vista esquemática de la estructura de la pared celular de *Scenedesmus* (modificado de D'Hondt et al., 2017), donde se indican: PL = capa de pectina, AL = capa basada en algaenano (trilaminar), FL = capa fibrilar, CM = membrana celular; c) Composición y arquitectura de la pared celular de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM bajo condiciones normales de crecimiento; d-f) Condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-limitado): se observó acumulación de almidón y lípidos, mientras que la capa trilaminar de algaenano se mostró difusa y el grosor de la pared celular aumentó respecto a las condiciones de crecimiento normales; d) fase intermedia, f) fase final; g-i) Condiciones de deficiencia de nitrógeno combinada con un pulso ácido (N-limitado+pulso ácido): los lípidos se convirtieron en el componente principal de las

células; además, las capas de pectina y fibrilar se observaron más gruesas que bajo condiciones normales, mientras que la capa de algaenano prácticamente desapareció; g) fase intermedia, h) fase final, i) detalle de la pared celular en fase final. La barra de escala corresponde a: a, d-e, g-h = 1 μm ; c, f, i = 250 nm.

4.4.2 Cultivo en la intemperie bajo condiciones de crecimiento en un FCB

Se evaluó la capacidad de *S. obtusiusculus* AT-UAM para su cultivo en la intemperie, para observar el efecto de las variaciones de la temperatura y realizar una comparación con el cultivo en limitación de la fuente de nitrógeno con y sin acidificación. Pese a la fluctuación de las condiciones climáticas, la microalga fue capaz de alcanzar una biomasa de 3.7 g L⁻¹ (**Tabla 4.1**), un valor similar a lo reportado en condiciones de laboratorio (Cabello et al., 2015). La tasa de crecimiento (μ) fue de 0.22 d⁻¹, con productividades de biomasa de 200 mg L⁻¹ d⁻¹ y eficiencia fotosintética del 4.11 %. Estos valores, son similares a los 220 mg L⁻¹ d⁻¹ reportados por Morales et al., (2018), cuando la misma cepa fue cultivada en un fotobiorreactor air-lift en la intemperie durante el periodo de otoño.

La irradiancia y la temperatura fueron monitoreados a lo largo de los experimentos, y se observó que la irradiancia superaba los 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (108,000 luxes), así como, la temperatura del medio de cultivo alcanzó hasta los 38°C durante el día y bajaba hasta los 5°C en la noche (**Tabla 4.1**). Los valores promedio de la composición bioquímica de la biomasa microalgal fueron de: 45 % proteínas, 37 % carbohidratos, 0.8 % clorofilas, 12 % lípidos y 5 % cenizas. Esta composición es similar a lo reportado por Cabello et al., (2015), bajo condiciones de crecimiento.

La curva P-I reportada para *S. obtusiusculus* AT-UAM indica que la zona de irradiancia de saturación está entre los 300-970 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cabello et al., 2015). En este trabajo, la irradiancia alcanzó valores de hasta 2300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ donde *S. obtusiusculus* AT-UAM no se vio afectada o fotoinhibida. Koller et al., (2016) reportan que la irradiancia inicial puede afectar la concentración máxima de biomasa, debido a que produce un alto nivel de estrés, provocando que se alargue el periodo de la fase lag. Cuando se evaluó el crecimiento de una cepa de *S. obtusiusculus* en un FPP, bajo condiciones de irradiancia de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la concentración de biomasa máxima alcanzada fue de 4.95 g L⁻¹ (Koller et al., 2016). Por otra parte, si la irradiancia es insuficiente, la productividad de biomasa puede ser menor

debido a la limitación de la fuente de energía o por el efecto de autosombreado ocasionado por las células de microalgas (Richmond and Hu, 2013).

Tabla 4.1. Resumen de los resultados de biomasa y contenido lipídico de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno y limitación de nitrógeno con acidificación controlada, evaluado en diferentes sistemas y condiciones (Laboratorio e Intemperie).

Experimento	Tiempo (días)	T _{rango} (°C)	I _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)	Productividad de biomasa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Lípidos (%)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	g _{lipidos} mol ⁻¹ _{photon}	PE (%)
Operación en condiciones controladas del FPP									
FPP N-completo*	-	35	320	3.7	970	14	-	-	4.4
FPP N-limitado	5.8	28.5**	100	1.52±0.11	240±5.52	30±1.55	72	0.32	7.1
FPP N-limitado+acidificación	5.8	28.5**	100	0.76±0.08	142±5.05	60±3.03	85	0.6	7.3
Operación en la intemperie del FCB									
FCB N-completo	16	5-40	1300	3.7±0.18	200±3.00	12±0.64	-	-	4.8
FCB N-limitado	12	8-36	1930	1.70±0.13	100±2.1	23±1.12	23	0.13	4.2
FCB N-limitado+acidificación	10	10-38	2300	1.24±0.04	147±3.38	45±2.20	66	0.17	4.5
Operación en la intemperie del RWP									
RWP N-completo	22	8- 21	1520	0.8±0.05	36± 0.82	15±0.75	-	-	3.6
RWP N-limitado	16	8-19	1640	0.25±0.01	12 ±0.31	24±1.22	2.8	0.02	3.1
RWP N-limitado+acidificación	21	7-18	1580	0.24±0.01	11 ±0.27	45±2.31	4.9	0.03	3.4

Fotobiorreactor de Placas Planas, FPP, Fotobiorreactor de columna de burbujeo, FCB, Raceway pond, RWP, Eficiencia Fotosintética, EF, Radio Superficie Volumen, S/V, FPP 49 m⁻¹, FCB, 29.6 m⁻¹ y RWP 10 m⁻¹, se obtuvo considerando el radio entre el área iluminada del fotobiorreactor (m²) y el volumen de operación (m³). t-Test, p < 0.05.

Un factor importante en el cultivo de microalgas es la temperatura del medio de cultivo, en este estudio, las temperaturas que se alcanzaron en el FCB fueron entre 3-5 °C más altas que las reportadas en las condiciones ambientales es decir el FCB absorbe calor de la radiación solar. El control de la temperatura mejora en gran medida la productividad, sin embargo, genera un aumento en los costos del cultivo (Béchet et al., 2010, Richmond et al., 1990, Zhang et al., 1999). Las concentraciones de biomasa alcanzadas en condiciones de crecimiento confirman la adaptabilidad de *S. obtusiusculus* AT-UAM a las variables ambientales.

4.4.3 Cultivo a la intemperie en un FCB bajo limitación de nitrógeno y pH ácido.

Los FCB fueron operados durante 10 días en la intemperie bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno. Inicialmente, el pH fue mantenido en valores cercanos a 7 (etapas I y II), durante este periodo se lograba alcanzar una fase estacionaria de acumulación de lípidos (etapa II), finalmente se realizó la acidificación controlada para alcanzar un pH de 5.5 mediante la adición de HCl(1N) en el medio. La **Figura 4.5** muestra la productividad de biomasa y la acumulación de lípidos bajo condiciones de limitación. Además, se muestran las condiciones de operación (irradiancia y temperatura), así como la respuesta de las variables (pH y oxígeno disuelto). Como se puede observar, en los primeros días se presenta una fase de crecimiento exponencial (etapa I), después del día 3 el contenido de lípidos y la concentración de biomasa presenta solo ligeras variaciones hasta el final de la etapa II. (8.5 días). En este momento, la biomasa producida fue de 0.4 g L⁻¹ (concentración final de biomasa de 1.7 g L⁻¹), con una producción máxima de lípidos de 150 mg L⁻¹ (acumulación de 23 % g_{lípidos} g_{DCW}⁻¹). En la etapa 3, el contenido de lípidos aumentó de 30 % a 45 % g_{lípidos} g_{DCW}⁻¹ en solo un día, representando la mayor acumulación obtenida en el cultivo en la intemperie para esta microalga. Bajo estas condiciones la μ fue de 0.027 d⁻¹, equivalente a una productividad máxima de biomasa de 147 mg L⁻¹ d⁻¹. Durante las etapas I y II, los valores de pH variaron entre 6.6-7.6 durante el día, los rangos de temperatura se mantuvieron entre 10-31 °C, y la irradiancia alcanzó hasta los 2000 μ mol m⁻² s⁻¹. La concentración de oxígeno disuelto (OD), varió con los ciclos circadianos observándose un incremento durante las primeras horas del día y disminuyendo al atardecer, hasta llegar a concentraciones mínimas al anochecer. La respuesta de los lípidos fue similar a lo reportado en condiciones de laboratorio y se confirmó que la acidificación controlada mejora la acumulación de lípidos.

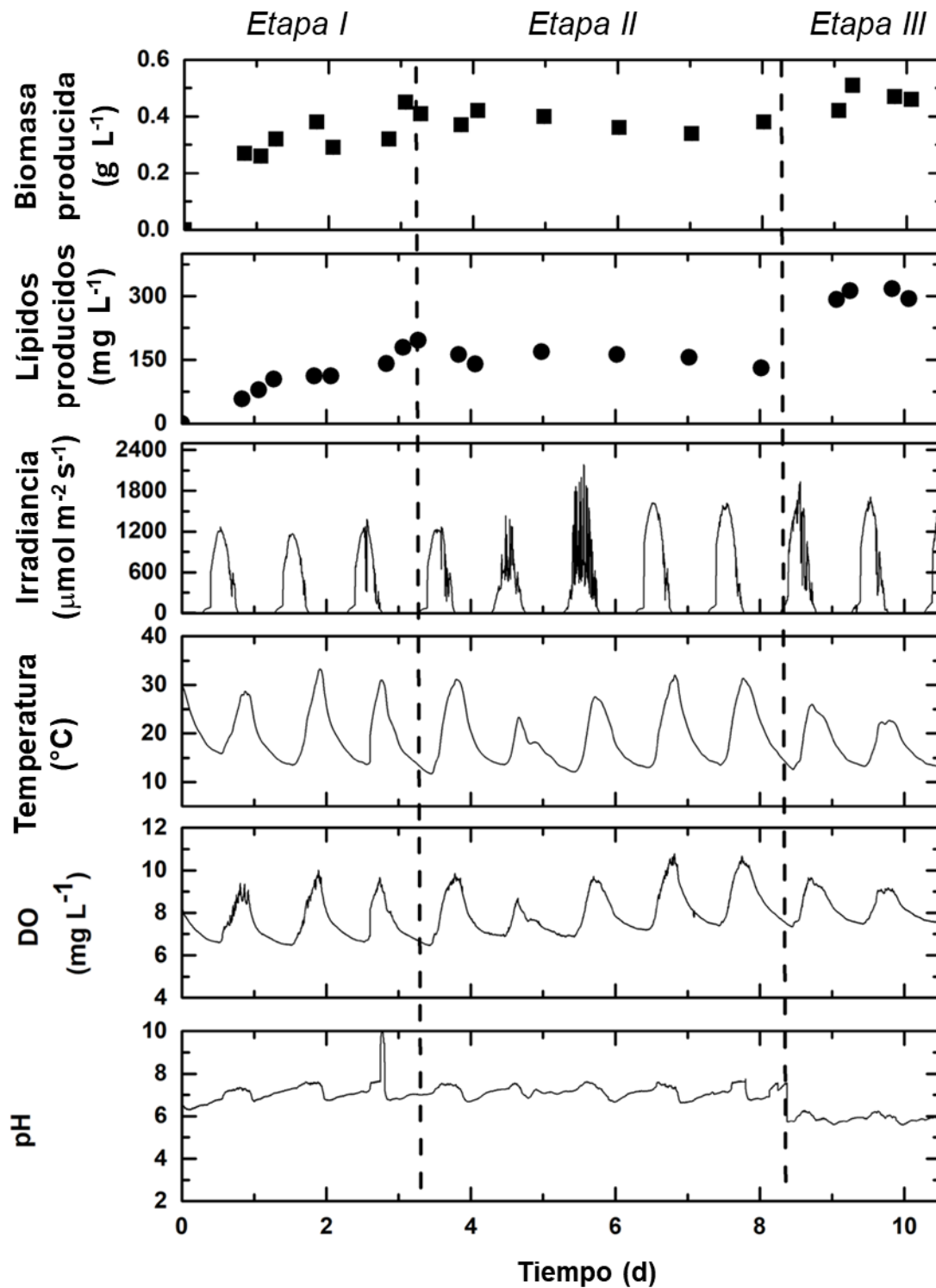


Figura 4.5. *S. obtusiusculus* AT-UAM cultivada en un fotobiorreactor FCB, con pulso ácido, biomasa, lípidos, pH, oxígeno disuelto, irradiancia y temperatura del medio operado en la intemperie.

Las condiciones del perfil bioquímico de la biomasa de la microalga al final del experimento fueron: 14 % de proteínas, 31 % carbohidratos, 45 % lípidos, 4 % cenizas, las concentraciones de clorofila no se cuantificaron debido a que, las concentraciones están por debajo del límite de detección.

4.4.4 Cultivo en RWP bajo condiciones de suficiencia y limitación de nitrógeno en la intemperie.

Los resultados del cultivo bajo condiciones de suficiencia y limitación de nitrógeno se describen en la **Tabla 4.1**. Cuando el cultivo de *S. obtusiusculus* AT-UAM se encuentra en condiciones de suficiencia de nitrógeno alcanzó una concentración de biomasa de hasta 0.8 g L^{-1} , con una temperatura promedio del medio de cultivo de $21 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, logrando una productividad de biomasa de $36 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Cuando la microalga es cultivada en condiciones de limitación de nitrógeno, la biomasa alcanzó una concentración de biomasa de 0.25 g L^{-1} , con $24 \text{ \% g}_{\text{lípidos}} \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1}$ de contenido de lípidos y cuando se aplicó la acidificación controlada, la biomasa alcanzó 0.24 g L^{-1} . Sin embargo, el contenido de lípidos incrementó hasta $45 \text{ \% g}_{\text{lípidos}} \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1}$. La **Figura 4.6**, se observa una comparación de la producción volumétrica de lípidos, alcanzando hasta 60 mg L^{-1} en el RWP con limitación de nitrógeno y 80 mg L^{-1} cuando se aplicó la limitación de nitrógeno con la acidificación controlada. En este experimento la composición bioquímica de la biomasa microalgal en el RWP fue 13 % proteínas, 26 % carbohidratos, 45 % lípidos y 16 % cenizas. Una característica que se presentó en los sistemas de cultivo (FCB Y RWP) fue una coloración amarillenta que puede indicar la presencia de carotenos ocasionada por las condiciones de limitación de nitrógeno y se relaciona con la activación mecanismos de reserva de energía que es ocasionado por el estrés de la limitación (Richmond y Hu, 2013, Eustance et al., 2016b). Las deficiencias de nitrógeno ocasionan diversas respuestas metabólicas en las microalgas, estas incluyen, una baja en la concentración de pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y b, lo que genera un cambio en la coloración del medio de cultivo de verde a amarillo (Feng et al., 2011). También se observó, que independientemente del sistema de cultivo (FPP, FCB, RWP), la composición bioquímica de *S. obtusiusculus* AT-UAM cultivada en laboratorio o en la intemperie es similar, a pesar de estar expuesta a los ciclos circadianos de irradiancia y temperatura. Por otra parte, el crecimiento de la microalga fue menor en los sistemas de cultivo RWP que en los FCB. La capacidad de acumular lípidos en los sistemas RWP bajo condiciones de limitación es similar a lo obtenido en los FCB.

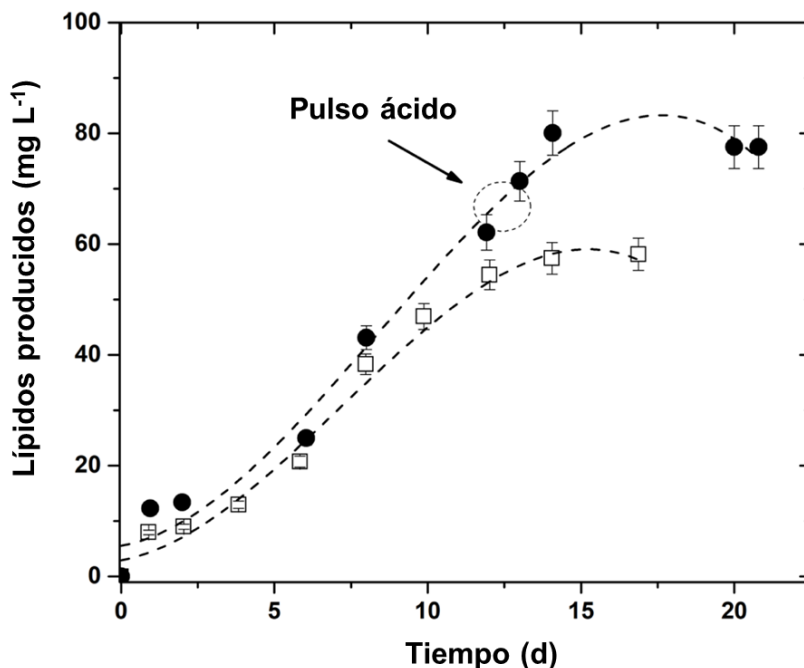


Figura 4.6. Acumulación de lípidos en el sistema Raceway Pond, RWP, con N-limitado (□) y N-limitado + pulso ácido (●).

En los RWP, la acidificación controlada se realizó cuando el contenido de lípidos está por alcanzar un estado estacionario (día 12, **Figura 4.6**), adicionando una solución de HCl (1 N) hasta alcanzar el pH de 5.5, la cual favoreció la acumulación de lípidos pasando de 24 % a 45 % $g_{lipidos} g_{DCW}^{-1}$ lo que representa un incremento de 1.87 veces el contenido de lípidos.

Todos los resultados de la operación de los sistemas están reportados en la **Tabla 4.1**, con la finalidad de poder analizar de forma global el efecto de la configuración de los sistemas y la implementación de la estrategia de acidificación controlada (limitación de nitrógeno + acidificación) sobre la productividad de biomasa que es uno de los parámetros que más se ven afectados cuando se utiliza la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos (Santos et al., 2013, Siaut et al., 2011, Eustance et al., 2016a).

Se ha reportado ampliamente que la productividad de biomasa depende en gran medida del tipo de reactor, la geometría y las condiciones de operación, lo que dificulta realizar una comparación entre las distintas configuraciones de reactores (Koller et al., 2016). La

comparación se vuelve más compleja cuando el sistema es operado en la intemperie y en condiciones de limitación de nitrógeno, factores que afectan notablemente la productividad de la biomasa. Como se puede observar en la **Tabla 4.1**, las productividades más altas se alcanzaron en el FPP, siendo 5 veces más alta que la obtenida en el FCB, este efecto probablemente esté relacionado por las condiciones en las que se realizó el cultivo donde intervienen los cambios por los ciclos circadianos y las diferentes estaciones del año, lo anterior, debido a que los experimentos se realizaron en los periodos de verano y otoño, en estas estaciones son comunes las lluvias, días nublados y bajas temperaturas, Estas mismas condiciones afectaron la productividad de la biomasa en los RWP que fue una quinta parte de lo reportado en el FCB. Estos valores son consistentes con la diferencia reportada entre los sistemas abiertos, RWP y cerrados, FCB, que es entre 2-6 veces mayor para cepas de *Chlorella* y *Nanochloropsis* respectivamente (Wolf et al., 2016).

Así mismo, la productividad de la biomasa bajo condiciones de limitación de nitrógeno en los FPP ($240 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), fue 4 veces menor que el valor reportado por (Cabello et al., 2015), para *S. obtusiusculus* AT-UAM evaluada bajo condiciones óptimas de crecimiento en un FPP ($970 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Por otra parte, se observó una disminución de 1.7 veces en la productividad de la biomasa ($142 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), cuando la acidificación controlada fue aplicada, pero en este caso, la acumulación de lípidos se duplicó. Globalmente, la productividad lipídica fue 20 % mayor que la obtenida sin acidificación. Resultados similares fueron observados en los sistemas FCB y RWP operados en la intemperie, en ambas configuraciones, el contenido de lípidos alcanzó $45 \% \text{ g}_{\text{lipidos}} \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1}$ en condiciones de acidificación controlada y limitación de nitrógeno. La productividad de biomasa decae en comparación con las pruebas en condiciones de crecimiento. En estos casos, la productividad lipídica se incrementó 2.9 y 1.7 veces en comparación con los valores sin acidificación para el FCB y RWP respectivamente.

Santos et al., (2014), reportaron que limitar la fuente de nitrógeno en *Neochloris oleabundans* afecta la productividad de biomasa debido a que las células dejan de dividirse y simultáneamente se promueve la acumulación de lípidos. Se reportó que la productividad de biomasa disminuye un 77% cuando *N. oleabundans* es cultivada en condiciones de limitación de nitrógeno a pH de 8.2. Eustance et al., (2016a) reportaron resultados similares para *Scenedesmus acutus*, donde la productividad de biomasa fue de $50.92 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno y baja hasta los $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, cuando es cultivada en condiciones de limitación de nitrógeno en un RWP operado en la intemperie ($20 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3}$

L⁻¹ y una profundidad de 0.15m). También se ha reportado de la reducción de hasta tres veces la productividad de biomasa cuando se comparan cultivos en FPP vs RWP operado en la intemperie (Eustance et al., 2016b).

La **Tabla 4.1** muestra la eficiencia fotosintética (EF), que está relacionada con el rendimiento de la biomasa, y también, es un indicador importante del rendimiento del sistema. Como se puede observar, los valores más altos de EF se obtuvieron en el FPP, y fueron de 7.3 % bajo condiciones controladas. Para los sistemas operados en la intemperie, la EF fue mayor en los FCB (4.8 %) que en los RWP (3.6 %). Los valores obtenidos en este trabajo son muy cercanos a los valores teóricos máximos de 3.8-5.2 % para sistemas cerrados y similares los obtenidos por Wolf et al., (2016), en FPP (4.4 %) y 2.5 % en sistemas tubulares operados en condiciones de crecimiento con *Chlorella* sp. Los valores de la eficiencia fotosintética se incrementan por la relación superficie/volumen (S/V) hasta el punto de suficiencia de irradiancia. En este trabajo, la relación S/V para el FPP fue de 49 m⁻¹ que se encuentra en el rango de 43-73 m⁻¹ reportado como óptimo para la productividad de biomasa, este valor se obtuvo de la comparación de diferentes configuraciones de reactores. En este estudio, la relación S/V obtenida para el FCB fue de 29.3 m⁻¹ y para el RWP de 10 m⁻¹, valores que se encuentran fuera del rango y que probablemente afecten la EF.

Otro parámetro reportado para *S. obtusiusculus* AT-UAM es el rendimiento lipídico cuántico, que es de 0.39 g_{lípidos} mol_{foton}⁻¹ en el FPP (Cabello et al., 2015), este valor es menor que el obtenido en este trabajo (**Tabla 4.1**), 0.6 g_{lípidos} mol_{foton}⁻¹ para condiciones de limitación de nitrógeno y acidificación en el FPP. Este valor es más alto que los 0.26 g_{lípidos} mol_{foton}⁻¹ reportado por (Breuer et al., 2013), quien incluyó por primera vez el rendimiento de los TAG en fotones para condiciones de limitación, y los 0.146 g_{lípidos} mol_{foton}⁻¹ reportados por Singh Khichi et al., (2018), para *Botryococcus barunii* cultivada en un FPP. La obtención de valores altos por *S. obtusiusculus* AT-UAM bajo condiciones de limitación de nitrógeno y acidificación indican que la estrategia funciona y es un indicador positivo en términos del balance de energía. Por otra parte, el rendimiento cuántico disminuye de 3.5 a 4.6 veces para los sistemas FCB y RWP operados en la intemperie, respectivamente y un ligero incremento fue observado cuando se aplicó la estrategia de acidificación en condiciones de limitación. Los rendimientos obtenidos con diferentes configuraciones de reactores operados en laboratorio y en la intemperie a mayor escala son prometedores, pero también nos indican la necesidad de optimizar los diseños y las condiciones de operación, además,

los resultados basados en la productividad de biomas y lípidos confirman que la estrategia es válida.

4.4.5 Perfil de FAMES

Uno de los factores más importantes para determinar el potencial de aplicación de lípidos acumulados por microalgas es el perfil de los metil ester de los ácidos grasos (FAMES por sus siglas en inglés). En este trabajo, se describe en la **Tabla 4.2** la composición de los ácidos grasos obtenidos en condiciones de limitación de nitrógeno y con acidificación que muestran perfiles similares en condiciones controladas y en la intemperie. También, cuando se comparan estos perfiles con reportes para condiciones de crecimiento, los componentes predominantes son, el ácido palmítico (30.2 %) y el ácido oleico (19.5 %), similar a los reportado previamente por (Toledo-Cervantes et al., 2013). Santos et al., (2014), reportó el perfil de *N. oleabundans*, cultivada en un FPP bajo condiciones de limitación de nitrógenos, con iluminación continua y un pH de 8 y 10, sus resultados indican que el pH tiene un efecto positivo sobre la acumulación de lípidos y este no modifica el perfil de los ácidos grasos. Por otro lado, Zhu et al., (2014), cultivó *Chlorella zofingensis* bajo condiciones de intemperie, utilizando agua residual artificial como medio de cultivo, con una regulación del pH entre 6.8 y 7.2 utilizando ácido acético, bajo estas condiciones reportaron un perfil de ácidos grasos similar al obtenido al cultivar la cepa sin control de pH.

La regulación del pH mejoró la acumulación de lípidos, así como, la productividad lipídica. Además, bajo estas condiciones de cultivo *Scenedesmus obtusiusculus*, mantuvo las propiedades del perfil de FAMES que se ajustan con las normas para su uso en la producción de biodiesel. Por lo tanto, los aceites producidos por *Scenedesmus obtusiusculus* pueden ser una materia prima con potencial para la producción de biodiesel.

Tabla 4.2. Perfil de FAMES en los lípidos acumulados en condiciones de laboratorio y en la intemperie.

Condiciones	Condiciones de crecimiento + 2 % CO ₂ (Toledo-Cervantes et al., 2013)	Pulso ácido pH 5.5 FPP Laboratorio En este trabajo	Pulso ácido pH 5.5 FCB Intemperie En este trabajo	Pulso ácido pH 5.5 RWP Intemperie En este trabajo	Laboratorio (Toledo-Cervantes et al., 2018)	Intemperie (Toledo-Cervantes et al., 2018)
Ácido Palmítico C:16 (%)	30.2	33.1±1.6	31.6±1.5	30.7±1.5	30	34
Ácido Palmítoleico C:16:1 (%)	7.3	4.9±0.2	4.2±0.2	3.6±.01	NR	NR
Ácido Estearico C18:0	NR	3.2±0.1	7.5±0.3	4.2±0.2	5	5
Ácido Oleico C18:1n9c (%)	26.2	35.7±1.7	33.9±1.6	37.2±1.86	21.9	33.1
Ácido Eláidico C18:1n9t (%)	19.5	NR	NR	NR	22.2	15
Ácido Linoleico C18:2n6c (%)	NR	1.1±0.05	5.2±0.2	4.4±0.2	11.3	12
Ácido γ-Linoleico C18:3n6 (%)	12.8	9.6±0.4	9.3±0.4	11.3±0.5	NR	NR
Ácido Cis-11-eicosenoico C20:1 (%)	NR	1.7±0.08	NR	NR	NR	NR
Otros	4	12.6±0.6	8.3±0.4	8.6±0.4	6	6

Fotobiorreactor de Placas Planas, FPP, Fotobiorreactor de columna de burbujeo, FCB, Raceway pond, RWP, No Reportado, NR.

4.5 Conclusión

En esta sección, se evaluaron con éxito las condiciones de cultivo de limitación de nitrógeno y acidificación controlada en diferentes configuraciones de reactor operados en el laboratorio y en la intemperie. La acumulación de lípidos aumento casi al doble del valor obtenido cuando el pH se controlaba en valores cercanos a 7. La estrategia de acidificación en condiciones controladas alcanzó un contenido de 60% $g_{lipid} g_{DCW}^{-1}$ superior a lo reportado previamente para *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, con una composición de FAMES adecuada para la producción de biodiesel. La limitación de nitrógeno es el método más comúnmente utilizado para desencadenar la acumulación de lípidos en las microalgas. Sin embargo, el cuestionamiento actual persiste debido a la disminución de la productividad de biomasa y se requiere más investigación para reducir los costos de producción y aumentar la productividad de lípidos.

Capítulo 5. Cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM para la captura de CO₂ y producción de luteína.

5.1 Resumen

La luteína, uno de los principales pigmentos fotosintéticos, es un producto natural prometedor tanto para aplicaciones nutricionales como farmacéuticas. Sin embargo, el obtener la luteína a partir de la biomasa microalgal involucra una etapa de disrupción celular previa a la extracción de este pigmento con solventes. En este trabajo se evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno para mejorar la acumulación de luteína en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM así como distintos métodos de disrupción celular para su recuperación. La disrupción con perlas de vidrio mostró la mayor eficiencia (92%), para romper células, superando significativamente a la criomolienda (47%) y la sonicación (20%). En cuanto a las fuentes de nitrógeno el NaNO₃ y la urea demostraron comportamientos similares, con máximos de biomasa de (3.2 - 3.4 g L⁻¹), luteína (8.2 - 8.7 mg L⁻¹) y productividad de luteína (2.02 - 2.15 mg L⁻¹ d⁻¹). Por otra parte, el (NH₄)₂SO₄ inhibió tanto la producción de biomasa como la de luteína debido a la acidificación del medio (pH<5). Estos resultados destacan que la disrupción celular con perlas es eficiente para lograr la extracción y que el NaNO₃ es la fuente preferida para esta cepa, además la limitación de la fuente de nitrógeno reduce la productividad de luteína.

5.2 Introducción

Las microalgas han surgido como una plataforma potencial para la producción de pigmentos donde destacan los carotenoides como la luteína, la astaxantina, la cantaxantina y el betacaroteno (A. Patel et al., 2022). Los carotenoides son isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, por algunos hongos y bacterias no fotosintéticas. En los organismos fotosintéticos los carotenoides están unidos a la membrana tilacoidal donde participan en la captación de luz y en la protección del aparato fotosintético del daño foto-oxidativo (Fu et al., 2023). Estructuralmente los carotenoides están formados por dos anillos de hexacarbonos unidos por una cadena conjugada de doble enlace de 18 carbonos. Se clasifican en hidrocarburos, denominados carotenos con una cadena lineal terminada en grupos cíclicos (anillos), los más abundantes son el α-caroteno y el β-caroteno; o carotenoides oxigenados denominados globalmente xantofilas que pueden clasificarse como aquellos que contienen los grupos hidroxilo (como en la luteína) o ceto (como en la

cantaxantina), o la combinación de ambos grupos (como en la astaxantina) (Iwamoto et al., 2024a).

Entre los carotenoides de mayor interés destaca la luteína ((3R, 3'R, 6'R)-β, ε-caroteno-3,3'-diol), es un carotenoide que podemos encontrar en las plantas, frutas, verduras, hongos, bacterias, levaduras y microorganismos fotosintéticos como las microalgas (Vadrале et al., 2023). (Figura 5.1)

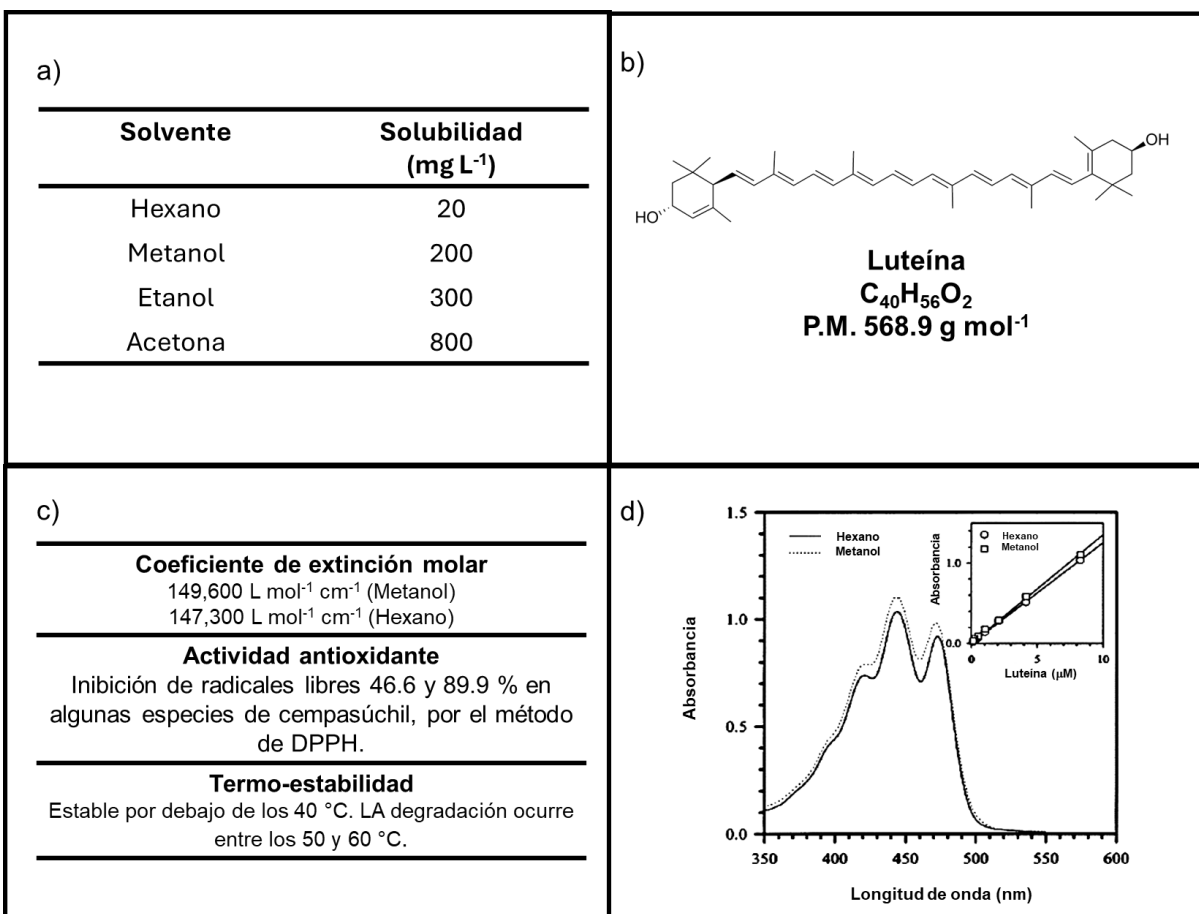


Figura 5.1. Propiedades de la Luteína a) Solubilidad, b) Estructura molecular, c) Propiedades fisicoquímicas y d) Espectro de absorción. Adaptado de Iwamoto et al., (2024).

El mercado global de la luteína ascendió a 344.40 millones de dólares en 2023 y se espera que alcance un valor de hasta 521.28 millones de dólares para el 2030 lo que indica un crecimiento anualizado del 6.1 % durante el periodo 2024-2030 (MMR, 2024). Actualmente, *Tagetes erecta*, llamada comúnmente como la flor de cempasúchil es la principal fuente comercial de la luteína con un contenido relativamente bajo (0.02-0.028 % g_{luteína}/g_{cempasuchil}), se requiere de un gran esfuerzo para extraerla y purificar hasta niveles adecuados para su

uso en alimentos o productos farmacéuticos (Muhammad et al., 2024a). En este contexto se ha demostrado que las microalgas superan a las plantas terrestres en términos de productividad de biomasa, eficiencia fotosintética, menor consumo de agua, mayor potencial para la mitigación de carbono. Además de sus ventajas productivas y ambientales, las microalgas presentan beneficios en la acumulación de luteína en forma libre a diferencia de la forma esterificada que es típica en las flores (Zheng et al., 2022).

Existen cepas que han sido evaluadas para su producción a mayor escala capaces de alcanzar altas productividades de luteína, como *Acutodesmus* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus incrasatulus*, *Scenedesmus almeriensis* (Fu et al., 2023, Camarena-Bernard y Pozzobon, 2024) A pesar de su potencial, la producción de luteína a escala industrial a partir de microalgas no es económicamente viable, lo que limita su implementación. Para lograr superar esta barrera es necesario reducir costos de producción, aumentar la productividad de la biomasa y luteína, optimizar los procesos posteriores al cultivo incluyendo cosecha, extracción, purificación y estabilización.

En términos de cultivos, se han propuesto diversos avances para la producción de biomasa y luteína. En este sentido los factores que influyen en el metabolismo de las microalgas modifican significativamente tanto a la producción de biomasa como el contenido de luteína, afectando su productividad. Bajo condiciones autotróficas, el CO₂ es la principal fuente de carbono, con concentraciones óptimas que varían según la especie. Se ha reportado que, *Chlorella minutissim* y *Desmodesmus* sp. F51 muestran una mayor productividad de luteína con 3.5% y 2.5% de CO₂, respectivamente (Dineshkumar et al., 2015, Chen et al., 2018). En cultivos heterotróficos y mixotróficos, la glucosa y el acetato son fuentes orgánicas comunes, aunque altas concentraciones de glucosa pueden reducir el contenido de luteína (Shi et al., 1999). El nitrógeno es crucial para la biosíntesis de luteína, siendo el nitrato, la urea y el amonio las fuentes más utilizadas. La urea es económicamente viable, mientras que el amonio puede acidificar el medio (Chen et al., 2018a). Por otro lado, la luz influye significativamente en la biosíntesis de luteína. Intensidades moderadas de luz (50-400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), favorecen su acumulación, aunque especies como *Chlorella zofingensis* responden mejor a altas intensidades (Huang et al., 2018). La luz azul es particularmente efectiva, aumentando el contenido de luteína en *Chlorella* sp. AE10 un 63% comparado con luz blanca (Li et al., 2019). La temperatura óptima para la producción de luteína oscila entre 30-40°C, aunque valores extremos pueden inhibir su acumulación (Ma et al., 2020). Otros factores que pueden influir son el estrés salino y los metales traza. El estrés salino

moderado puede estimular la producción de luteína en especies como *Coccomyxa onubensis* que alcanza 7.8 mg/g con 500 mM de NaCl (Bermejo et al., 2018).

El procesamiento posterior al cultivo de la biomasa de microalgas para la producción de luteína incluye etapas clave como la cosecha, el secado, el pretratamiento alcalino y la extracción, cada una con implicaciones en la eficiencia y costos del proceso (Iwamoto et al., 2024a). La cosecha, para separar a las células del medio de cultivo, puede realizarse mediante centrifugación, pero con un alto consumo energético. Lo anterior ha impulsado alternativas como la floculación con polímeros naturales como el quitosano (Lama et al., 2016) y el almidón de semillas de yaca, especialmente útil en especies como *Chlorella sorokiniana* (Gayathri et al., 2020). Posteriormente, sigue el secado, aunque empleado convencionalmente, puede omitirse, debido al uso de técnicas de extracción directa de biomasa húmeda con solventes polares como etanol o acetona, método que ha demostrado mayor rendimiento en *Chlorella vulgaris* (Gong and Bassi, 2017, Yadav et al., 2020). El pretratamiento alcalino con KOH, común en la industria de flor de cempasúchil, se ha adaptado para microalgas, aunque muchas cepas como *Arthrospira platensis* presentan luteína libre, lo cual reduce su necesidad (Aburai et al., 2013). La extracción con solventes orgánicos (p.e. etanol, Tetra hidro furano, THF) sigue siendo predominante, mientras técnicas innovadoras como CO₂ supercrítico o ultrasonido enfrentan desafíos de escalabilidad (Molino et al., 2018). La purificación con N₂ y la suspensión en aceite vegetal (20 mg mL⁻¹) aseguran estabilidad y aplicabilidad nutracéutica (Chen et al., 2016).

En este trabajo se evaluaron algunos factores que influyen en la acumulación y extracción de la luteína en la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Se determinaron, las mejores condiciones de cultivo evaluando diferentes fuentes de nitrógeno (NaNO₃, Urea, (NH₄)₂ SO₄) y su efecto sobre la biosíntesis de luteína. También, se evaluó el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la productividad de luteína. De manera complementaria se compararon distintos métodos de disrupción celular (homogenización, criomolienda y sonicación), para lisar la célula y mejorar la extracción del pigmento.

5.3 Materiales y Métodos

5.3.1 Cepa y medio de cultivo

En este trabajo se utilizó la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, cultivada en medio mineral BG-11 (véase la sección 3.3).

5.3.2 Fotobiorreactor

Se utilizaron dos sistemas de Placas Planas (FPP), para evaluar las estrategias de acumulación de luteína en condiciones controladas (ver sección 3.4.1).

5.3.3 Estrategias para la evaluación de los métodos de lisis celular

Se realizó una evaluación comparativa de tres métodos de disrupción celular, evaluando su eficiencia mediante el conteo celular en cámara de Neubauer. 1) Disrupción mecánica, se utilizó un homogeneizador de perlas (Mini-beadbeater 24), operado a una velocidad de 3450 rpm, adicionando 250 mg de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro), se evaluaron tres tiempos de tratamiento de 1, 2 y 3 minutos, 2) Sonicación, para evaluar este método se utilizó un sonicador (230 V, serie CPXH), a una frecuencia de 40 kHz, con tres periodos de 30, 60 y 90 minutos a una temperatura controlada de 30 °C para evitar la degradación térmica, 3) Criomolienda, la biomasa de microalga se sometió a una congelación rápida con nitrógeno líquido (-196°C) seguida de una molienda mecánica con ayuda de un mortero de porcelana previamente enfriado para evitar la descongelación de las muestras. Para evaluar la eficiencia de cada método se cuantificó mediante conteo en cámara de Neubauer antes y después de cada tratamiento, contabilizando el porcentaje de celular intactas presentes. Todos los experimentos se realizaron con una concentración de biomasa de 3 g L⁻¹ y por triplicado.

5.3.4 Estrategia para la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno en un Fotobiorreactor de Placas Planas operado en condiciones controladas.

Los experimentos se realizaron con una concentración de biomasa inicial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM de 0.15 g L⁻¹, bajo las siguientes condiciones de operación, temperatura de 35 °C, irradiancia de 300 μmol m⁻² s⁻¹, un flujo continuo de aireación en mezcla con 2% de CO₂, suministrado a una velocidad superficial de 0.008 m s⁻¹, con un volumen de operación del reactor de 1.8 (Cabello et al., 2015). Se evaluaron tres fuentes de nitrógeno considerando el contenido el medio mineral BG-11 utiliza nitrato de sodio (NaNO₃) y equivale a 249 mg_{Nitrógeno} L⁻¹. Las concentraciones de Urea y sulfato de amonio ((NH₄)₂ SO₄), se calcularon para tener un a equivalencia en contenido de nitrógeno (249 mg_{Nitrógeno} L⁻¹), respecto al control. Se evaluó de la acumulación de la luteína en el tiempo.

5.3.5 Estrategia para la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno en un Fotobiorreactor de Placas Planas operado en condiciones controladas.

Los experimentos se realizaron con biomasa previamente cultivada con medio mineral BG-11. La biomasa fue recuperada y concentrada mediante un proceso de centrifugación y lavada dos veces con agua destilada. La biomasa fue re-suspendida en medio mineral BG-11 2X que no contenía ninguna fuente de nitrógeno para alcanzar una concentración inicial de biomasa de 0.5 g L⁻¹. Los FPP fueron operados en las condiciones óptimas de acumulación de lípidos previamente reportadas por (Cabello et al., 2015), a una temperatura de 28.5 °C y 100 μmol m⁻² s⁻¹. Las respuestas fisiológicas debido a las condiciones de limitación de nitrógeno fueron evaluadas con la concentración de luteína en la biomasa

5.3.6 Métodos analíticos

5.3.6.1 Análisis de la biomasa

La concentración de biomasa, luteína en la biomasa, y los nitratos disueltos en el medio de cultivo fueron evaluados de acuerdo con lo reportado en la sección 3.5.

5.3.6.2 Parámetros cinéticos

La tasa específica de crecimiento (μ , d⁻¹), la productividad de biomasa (P_b , g L⁻¹ d⁻¹) y la productividad de luteína (P_L , g L⁻¹ d⁻¹), fueron calculados de acuerdo con lo reportado en la sección 3.6.

5.4 Resultados

5.4.1 Evaluación de los métodos de lisis celular

En la **Tabla 5.1**, se presenta una comparación de los tres métodos de disrupción celular evaluados para la extracción de la luteína a partir de la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Se evaluaron condiciones operativas, tiempos de procesamiento y la eficiencia en la ruptura celular. La disrupción mecánica con perlas demostró ser el método más eficiente y rápido en comparación con los otros métodos evaluados. La criomolienda y sonicación mostraron limitaciones de eficiencia (50% menores con respecto a la disrupción mecánica) y escalabilidad respectivamente.

Tabla 5.1. Comparación de los métodos de disrupción celular.

Método	Condición	Tiempo	Eficiencia	Comentario
Disrupción mecánica con perlas de vidrio	500mg de perlas de disrupción	1 minuto	35%	Todas las células se rompen y la luteína queda disponible en un proceso de 5 minutos.
	+1.5ml de muestra con 3 g L ⁻¹	2 minutos	69%	
		3 minutos	92%	
Criomolienda	N ₂ Liquido, 5ml s de muestra con una concentración de of 3 g L ⁻¹ , se trituro con ayuda de un mortero manualmente	--	47%	Baja eficiencia, poco escalable.
Sonicación	5 ml de muestra en un baño de agua con una concentración de 3 g L ⁻¹ , a 30 °C.	30 minutos	17%	Requiere demasiado tiempo, no se tiene control sobre la temperatura y es poco escalable
		60 minutos	19%	
		90 minutos	20%	

Posterior a la recuperación de biomasa la disrupción celular en un paso esencial en la extracción de luteína. Postma et al., (2015) reportaron la evaluación de la disrupción mecánica para *Chlorella vulgaris*, en concentraciones de 25 a 145 g L⁻¹, con tiempos de disrupción de 500s, utilizando perlas de zirconio, logrando alcanzar eficiencias de disrupción celular superiores al 97 %. en todas las concentraciones evaluadas. Por otro lado, una investigación realizada con *Chlorella* P12, donde se evaluaron diferentes equipos de disrupción mecánicos, encontró que la eficiencia de ruptura celular puede variar de acuerdo con el equipo que se esté utilizando, al diámetro de las perlas (0.3-07 mm), el material del que están hechas las perlas (vidrio o zirconio) y la concentración de biomasa, a pesar de esta variación en las eficiencias de ruptura celular pueden alcanzar valores >90% de eficiencia de ruptura celular cuando los parámetros son optimizados (Doucha y Lívanský, 2008).

La disrupción celular con perlas es un método usado frecuentemente a escala industrial, permite cargas de biomasa de 60–150 g L⁻¹, alcanzando eficiencias de hasta del 98% con bajo consumo energético (0.43 kWh kg⁻¹)(Soto-Sierra et al., 2018). Sin embargo, es importante resaltar la necesidad de optimizar los métodos de disrupción para lograr equilibrar la eficiencia, escalabilidad y preservación del compuesto de interés

5.4.2 Efecto de la fuente de nitrógeno en la acumulación de luteína

La luteína es un metabolito primario y su síntesis está asociada con el crecimiento. Por lo que, la disponibilidad de nitrógeno es un factor que mejora la acumulación en las microalgas (Iwamoto et al., 2024a). En la **Figura 5.2**, se muestra la cinética de acumulación de luteína cuando se evalúan diferentes fuentes de nitrógeno, se puede observar que el NaNO₃ y la urea tiene un comportamiento similar, en el crecimiento de la biomasa alcanzando una concentración máxima de 3.2 y 3.4 g L⁻¹, respectivamente. En cuanto al acumulación de luteína se alcanzaron valores de 8.7 y 8.2 mg_{luteína} L⁻¹ con productividades de 2.15 y 2.02 mg_{luteína} L⁻¹ d⁻¹ para NaNO₃ y la urea, respectivamente. Por otro lado, al utilizar (NH₄)₂SO₄ no hay un incremento en el contenido de luteína y puede deberse a que *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM no tuvo la capacidad de amortiguar la caída del pH (<5) derivada de la acidificación del medio de cultivo.

La fuente de nitrógeno constituye un elemento fundamental tanto para la biosíntesis de luteína como para la acumulación de biomasa microalgal. En estudios con *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 han establecido que la eficiencia de la fuente sigue el orden: urea > amonio > nitrato, tanto para concentración de biomasa como para productividad de luteína (Chen et al., 2018).

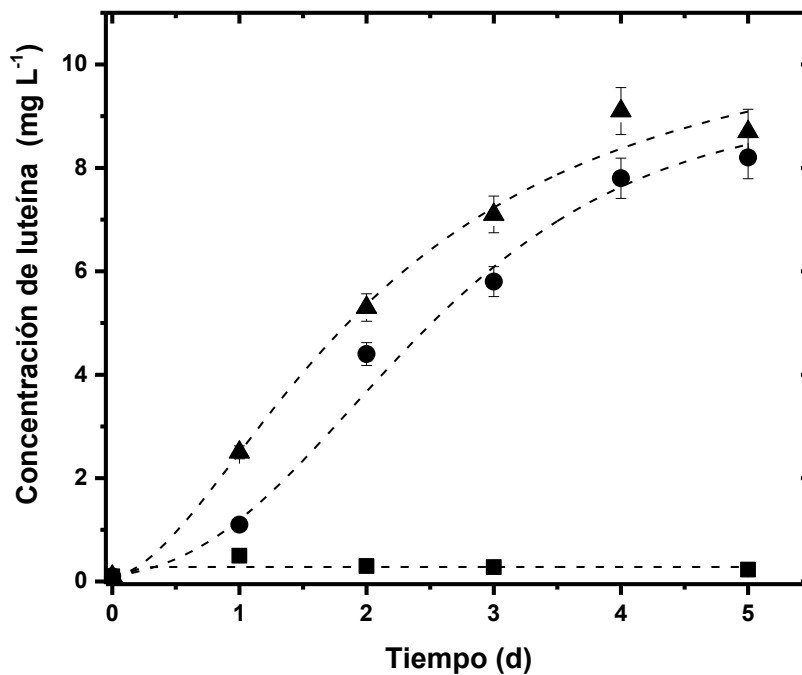


Figura 5.2. Producción de luteína utilizando diferentes fuentes de nitrógeno, NaNO₃ (▲), Urea (●), (NH₄)₂SO₄ (■).

Si bien el amonio presenta ventajas en su asimilación inmediata y menor costo energético (Xie et al., 2017), su uso conlleva una acidificación del medio por liberación de H⁺ durante el crecimiento celular, esta limitación puede ser superada mediante estrategias como el uso combinado de NaHCO₃ y CO₂, logrando productividades de luteína de 5.22 mg L⁻¹ día⁻¹ en *Desmodesmus* sp. F51 (Xie et al., 2017). Considerando los aspectos económicos, donde el costo del nitrógeno sigue el orden urea < amonio < nitrato (Chen et al., 2018b), la urea emerge como la alternativa más viable para la producción industrial de luteína, al combinar alta eficiencia de asimilación, estabilidad del medio de cultivo y favorable relación costo-beneficio, pero requiere estrategias adicionales para el control de pH y su implementación efectiva. Los resultados de trabajo demuestran que *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM tiene una mayor afinidad por el NaNO₃ como fuente de nitrógeno, evidenciando tener una mayor concentración de biomasa, acumulación y productividad de luteína.

5.4.3 Efecto de la limitación de nitrógeno en la acumulación de luteína

La evaluación de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM bajo efecto de diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno demostró diferencias significativas en la producción de luteína y biomasa. En condiciones de disponibilidad de nitrógeno (N-completo), se alcanzó un valor de contenido máximo de luteína (12 mg L⁻¹), en el cuarto día, con una productividad máxima de luteína fue 3.2 mg L⁻¹ d⁻¹, la concentración de biomasa que alcanzó los 3.7 g L⁻¹ con una tasa de crecimiento de 0.8 d⁻¹. Por otro lado, cuando el nitrógeno está limitado (N-limitado), estos valores disminuyen notablemente a 6.9 mg L⁻¹ la concentración de luteína y 1.8 mg⁻¹ d⁻¹ la productividad de luteína (**Figura 5.3**).

Estos resultados son similares a estudios previos donde se evaluó el efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la biosíntesis de luteína. En *Chlorella zofingiensis*, la deficiencia de nitrógeno redujo drásticamente el contenido de luteína bajo alta irradiación (Cordero et al., 2012), mientras que en *Desmodesmus* sp. se observó un incremento del 32% (de 3.76 a 4.97), al elevar la concentración inicial de nitrato de 4.4 a 13.2 mM (Xie et al., 2013). Resultados similares se reportaron en *Chlorella vulgaris*, donde la suplementación con nitrato aumentó el contenido de luteína hasta 10.5 mg_{Luteína}/g_{biomasa} (McClure et al., 2019).

La acumulación de luteína en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM está influenciada por los factores ambientales (temperatura, fuente de nitrógeno, irradiancia, salinidad) y

condiciones de estrés que pueden provocar alteraciones en la composición bioquímica, así como, en el crecimiento de la biomasa microalgal.

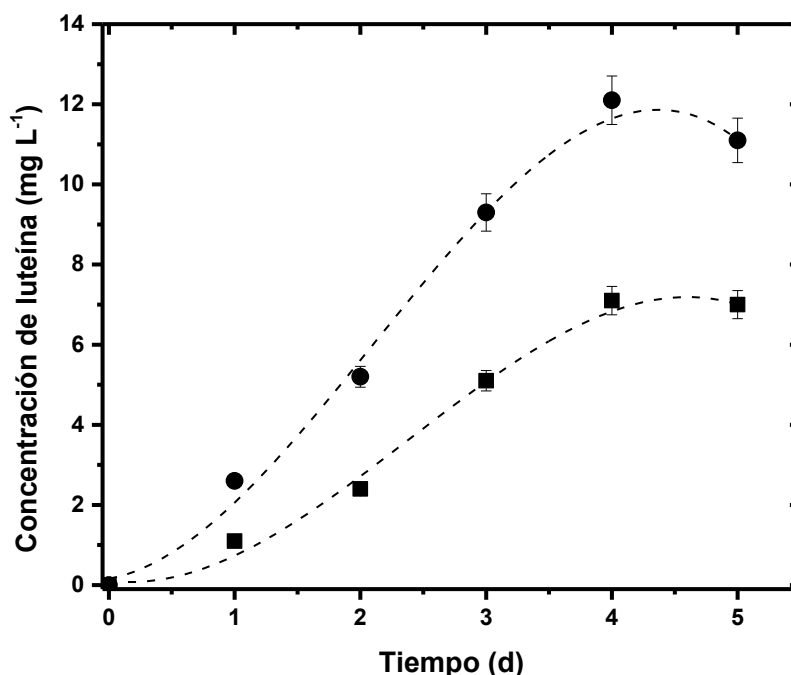


Figura 5.3. Producción de luteína bajo diferentes condiciones de crecimiento. N-completo (●), N-limitado (■).

La productividad máxima de luteína por *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM obtenida bajo esta condición fue 3.2 mg L⁻¹ d⁻¹ y este valor es cercano a los valores reportados en la literatura por *Scenedesmus obliquus* FSP- (4.15 mg L⁻¹ d⁻¹) y *Scenedesmus almeriensis* (4.9 mg L⁻¹ d⁻¹) los cuales son consideradas cepas productoras de luteína. Estos resultados sugieren que *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM presenta comportamientos similares bajo condiciones de disponibilidad de nitrógeno y su productividad aun que es inferior presenta competitividad con respecto a las cepas reportadas (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2. Comparación de cepas acumuladoras de luteína.

	Luteína (mg g _{biomasa})	Productividad (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Condiciones	Referencia
<i>Tagetes erecta</i>	17-570mg por cada100g de pétalos	---	Cosecha estacional en campos italianos.	Picaglia et al., 1998.
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	5.5	4.9	Sistema de 2L, Iluminación continua.	Sánchez et al., 2008.

<i>Scenedesmus obliquus</i> FSP-3	4.52	4.15	Sistema 1L. Iluminación Continua.	Ho et al., 2014
<i>Chlorella sorokiniana</i>	3.0	2.2	Sistema 1L. Iluminación Continua.	Cordero et al., 2011.
<i>Chlorella zoofigensis</i>	3.5	1.2	Sistema 0.2L. Iluminación Continua.	Del campo et al., 2000.
<i>Chlorella prothotecoides</i>	4.6	10	Sistema 16L, cultivo heterotrófico.	Wei et al., 2008.
<i>Muriellopsis sp.</i>	5.5	0.8-1.4	Sistema 0.2L. Iluminación Continua.	Del Campo et al., 2000
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	3.8	3.2	Sistema 1.7L, Iluminación continua.	En este estudio

5.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la producción de luteína a partir de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, depende del método de disrupción celular y de la fuente de nitrógeno empleada. La disrupción mecánica con perlas de vidrio demostró ser el método más eficiente, alcanzando un 92 % de ruptura celular, superando significativamente a los métodos de criomolienda y sonicación.

En cuanto a las fuentes de nitrógenos, el nitrato de sodio (NaNO₃) y la urea presentaron el mejor desempeño, con valores similares en la acumulación de biomasa, contenido de luteína y productividad. Sin embargo, el sulfato de amonio, resultó tener un efecto negativo en la biomasa, inhibiendo el crecimiento y la acumulación de luteína.

Bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno (NaNO₃), *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM alcanzó una productividad máxima de luteína de 3.2 mg L⁻¹ d⁻¹, valor cercano a lo reportado por otras cepas productoras de luteína, lo que sugiere su potencial para aplicaciones a mayor escala.

Capítulo 6. Evaluación del cultivo a gran escala de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, para el acondicionamiento de una corriente de gases de combustión para la producción de biomasa

6.1 Resumen

En este capítulo la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM fue evaluada en un sistema RWP y en un reactor híbrido, ambos operados a la intemperie, con el objetivo de determinar su capacidad de crecimiento, productividad de biomasa y perfil bioquímico bajo distintas condiciones ambientales. En el sistema RWP, el cultivo en lote permitió alcanzar una biomasa máxima de 0.5 g L^{-1} en un periodo de 23 días, mientras que en operación semi-continua se logró una productividad de hasta $14.7 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, favorecida por el control de temperatura que mantuvo el medio de cultivo entre 5 y $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por encima de la temperatura ambiente. El análisis del perfil bioquímico indicó una composición estable, similar a lo reportado en la literatura, con un promedio de 52 % de proteínas, 21 % de carbohidratos, 14 % de lípidos y 2 % de clorofilas. En el reactor híbrido, utilizando un flujo de gas de combustión con 4.5 % de CO_2 , se obtuvo una biomasa máxima de 0.4 g L^{-1} en 13 días, alcanzándose la mayor productividad de biomasa ($123 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) bajo operación semi-continua. La eficiencia de remoción de gases de combustión (CO_2 , NO_2 y SO_2) fue del 100 % durante todas las etapas experimentales. Además, el perfil bioquímico de la biomasa mostró una alta estabilidad, con un contenido promedio de 57.94 % de proteínas, 12.9 % de carbohidratos y 10.4 % de lípidos. Para la recuperación de la biomasa, se utilizó quitosano como agente floculante, logrando una eficiencia superior al 99 % con una dosis de 60 mg L^{-1} en menos de 20 minutos. Estos resultados muestran que *S. obtusiusculus* AT-UAM posee un alto potencial para la producción sostenible de biomasa y la biomitigación de gases de efecto invernadero en diferentes periodos de operación.

6.2 Introducción

El dióxido de carbono (CO_2), representa el 68% de las emisiones gaseosas de los Gases de Efecto Invernadero (GEI), como resultado de la actividad antropogénica. Aproximadamente 33.5 Gt de CO_2 se emite a la atmósfera cada año y el 40% de estas emisiones es generado a partir de plantas de energía a base de combustibles fósiles. Por lo anterior, es importante desarrollar tecnologías para la captura, utilización y almacenamiento del CO_2 (CCUS por sus siglas en inglés), que sean de bajo costo

económico y energético(Singh y Dhar, 2019). La captura biológica del CO₂ mediante el uso de microalgas se ha considerado un método prometedor para la reducción de emisiones de CO₂. Las microalgas tienen la capacidad de convertir la energía solar en energía química a través de una reacción con la luz y el CO₂ para generar materia orgánica en una reacción oscura que no genera contaminantes secundarios(Nagappan et al., 2020).

El cultivo de microalgas utilizando gases de combustión tiene una mayor complejidad en comparación con el uso de aire atmosférico. Debido a una alta concentración de CO₂ en los gases de combustión que usualmente se encuentra en rangos de 10-20 % mientras la concentración óptima para el cultivo de microalgas está por debajo del 10%. Por lo tanto, para maximizar la eficiencia de los cultivos de microalgas para la fijación del CO₂, es necesario considerar las altas concentraciones presentes en los gases de combustión y como esto podría afectar las funciones biológicas en las microalgas (Wang et al., 2014).

Algunos de los principales factores que afectan el tratamiento de las corrientes gaseosas de gases de combustión basado en microalgas son la tolerancia al CO₂, tasa de fijación de CO₂, velocidad de alimentación del gas de combustión, la solubilidad del gas de combustión y la temperatura del gas de combustión(Cheng et al., 2019).

El paso de las diferentes especies de carbono inorgánico a través de la membrana de las microalgas es un aspecto importante para considerar. Esto va a depender de la concentración del CO₂ y de la especie de microalga. Existen tres estrategias para transferir CO₂ al interior de la célula (Mackinder et al., 2017). **Figura 6.1:** 1) Transporte de HCO₃⁻ por medio de transportadores activos en la membrana, 2) conversión de HCO₃⁻ en CO₂ para enriquecer localmente CO₂, que se difunde directamente en las células y 3) difusión directa de una alta concentración de CO₂ a través de la membrana.

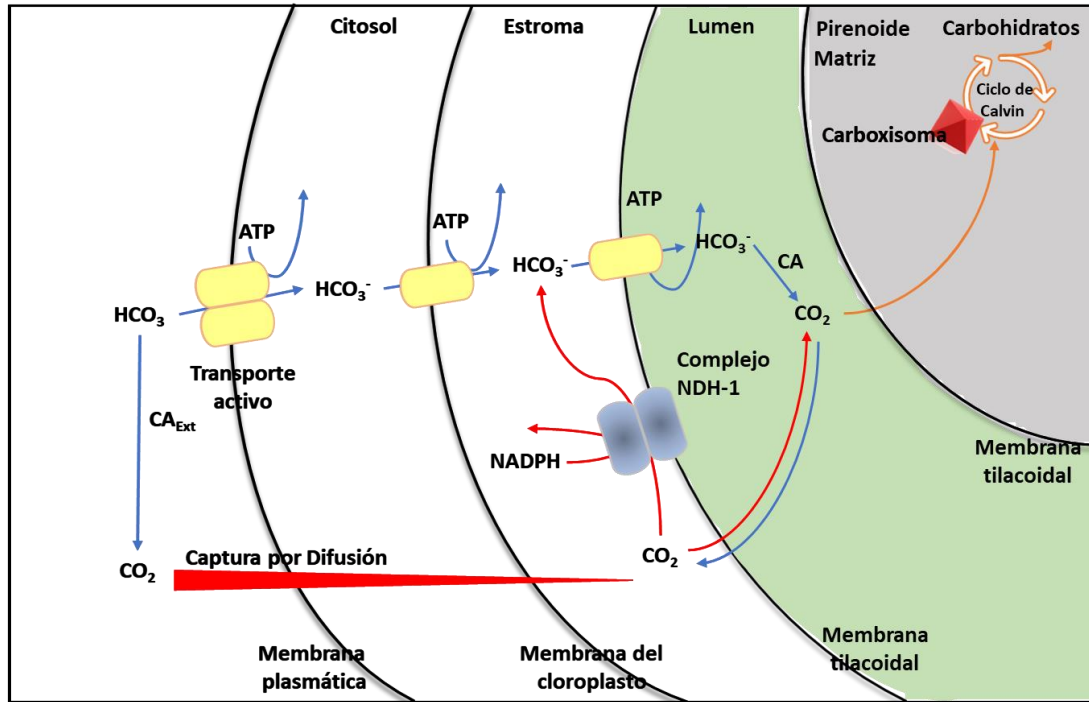


Figura 6.1. Flujo del carbono a través de la membrana celular.

Sin embargo, la capacidad de las microalgas para transformar el CO_2 también se ve afectada por el tipo y la cantidad de nutrientes, el pH, la salinidad, la concentración del oxígeno disuelto, la presencia de inhibidores, además de los parámetros ambientales como la intensidad de luz, los fotoperiodos y la temperatura (Nagappan et al., 2019).

Uno de los sistemas de cultivo más utilizados son los abiertos que comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito ("raceway ponds"). Los estanques de tipo "raceway" consisten en circuitos de 15 a 30 cm de profundidad, en los cuales gira una paleta a un flujo constante del cultivo para promover un mezclado adecuado del sistema (Borowitzka, 2013). Este tipo de sistemas presenta una baja productividad en la generación de biomasa ya que la concentración es de alrededor de 1 g L^{-1} con productividades de alrededor $10\text{-}25 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Estos sistemas son utilizados para la producción de metabolitos y el tratamiento de aguas residuales. Las ventajas que presentan estos sistemas son su sencillez, bajo costo de construcción, facilidad de operación y mantenimiento, sin embargo presentan diversos inconvenientes como la pérdida de agua por evaporación, transferencia limitada de CO_2 al cultivo por su baja concentración en el aire ($0.035\% \text{ v/v}$) y su difusión hacia la atmósfera, control limitado de las condiciones de cultivo, alta susceptibilidad a contaminarse, periodos amplios de

producción (6 a 8 semanas), producciones reducidas de biomasa y penetración limitada de la luz (Chisti, 2008, Pulz y Gross, 2004).

En ambos casos tanto en sistemas abiertos o cerrados, el objetivo biotecnológico es el crecimiento óptimo y la clave del éxito son factores como la luz, temperatura, nutrientes y el grado de mezclado (Pulz y Gross, 2004).

Para poder llevar acabo esto es necesario monitorear los parámetros de mayor interés en los biorreactores durante el cultivo de las microalgas y en los procesos de producción además de identificar los métodos para el monitoreo en línea de estos parámetros.

Las variables de proceso en los bioprocesos pueden ser categorizados desde dos puntos de vista: de acuerdo con la naturaleza física, química (o fisicoquímica), o biológica y de acuerdo con la fase en la cual son medidos (gas, líquido o biomasa). Por lo que las condiciones más importantes en los cultivos microalgales que influyen en el crecimiento son los siguientes:

- Variables físicas: Irradiancia (luz) en la actividad fotosintética en el rango de 400-700 nm (photosynthetically active radiance, PAR); temperatura e intensidad de mezclado.
- Variables fisicoquímicas: pH, concentración de CO₂ disuelto, O₂ disuelto y nutrientes (N y P) y la concentración de productos extracelulares.
- Variables biológicas: Concentración de la biomasa, concentración de los productos intracelulares, la eficiencia fotosintética (EF) y la conversión de la luz solar en biomasa, la morfología de la especie, la presencia de contaminación por otras especies de microalgas, bacterias, hongos u organismos predadores.

Todos estos aspectos influyen en el rendimiento del proceso y deben de ser controlados por medio del diseño, las condiciones del proceso de cultivo y a través del control activo del proceso basado en el monitoreo del proceso mediante mediciones en línea y fuera de línea.

Las condiciones más importantes son la irradiancia, temperatura, pH, O₂, CO₂ estos últimos en la fase gas y en la líquida además de los nutrientes inorgánicos principalmente N y P.

Sin embargo, en la práctica la principal meta es mantener el cultivo de las microalgas en las condiciones óptimas para mantener la productividad máxima. Para lograr esto se deben de considerar acciones de control simples y que no interfieran con las escalas de tiempo característico de crecimiento de las microalgas, como lo son:

- ❖ La regulación del pH que puede realizar mediante el control en la velocidad de inyección de carbono inorgánico (generalmente CO₂). Utilizando un muestreo de pH en línea y un control PI (Proporcional Integral) o PID (Proporcional Integral-Diferencial) (Pawlowski et al., 2019). Alternativamente el uso de un MPC (Controlador Predictivo por Modelo), para la reducción de las pérdidas de CO₂ en reactores operados en la intemperie como lo propone (García-Sánchez et al., 2003)
- ❖ Regulación de la concentración de microalgas puede realizarse mediante el control de la retroalimentación midiendo la densidad celular, utilizando un sensor de transmitancia de luz NIR y controlando la inyección de medio de cultivo fresco (Sandnes et al., 2006).
- ❖ Regulación de la temperatura que se puede realizar mediante controladores, que mantengan la temperatura del medio de cultivo cercana a la óptima de crecimiento (Ras et al., 2013). Sin embargo, al realizar este tipo de regulación es necesario considerar que el gasto de energía no sea mayor a la energía generada por la biomasa o en su caso al incremento en la productividad. Se ha estimado la energía que se requiere para mantener regulada la temperatura en un fotobiorreactor operado en California a 25°C (la temperatura a la cual se mantiene el sistema sin control puede llegar por encima de los 40 °C), es alrededor de los 1.8 GJ año⁻¹ m⁻² que representan un equivalente a 0.3 barriles de petróleo por metro cuadrado (Béchet et al., 2010).

Actualmente se estudian microalgas que tengan potencial en la captura de CO₂, una de ellas es *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, que ha demostrado tener un gran potencial en las tasas de captura de CO₂, una alta acumulación de lípidos bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno (Toledo-Cervantes et al., 2013; Cabello et al., 2015). Esta cepa ha sido cultivada en condiciones externas demostrando su gran capacidad para soportar las variaciones de irradiancia y temperatura (Morales et al., 2018). También ha sido evaluada para su cultivo en sistemas híbridos, alimentados con corrientes de combustión simuladas y reales en sistemas con un volumen de 100L (Estrada-Graf et al., 2020).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en el acondicionamiento de una corriente de gases de combustión cuando es cultivada utilizando medios de cultivo alternativos en sistemas a gran escala.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Ceba y medio de cultivo

En este trabajo se utilizó la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, (véase la sección 3.3). Como medio de cultivo se utilizó un fertilizante foliar Bayfolan forte, la composición del fertilizante se indica en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1. Comparación de los medios de cultivo BG-11 y Bayfolan forte

<i>Medios de cultivo</i>				<i>Composición elemental</i>		
BG-11		Bayfolan forte*			BG-11	Bayfolan forte***
Composición	Concentración (g L ⁻¹)	Composición	Concentración (g L ⁻¹)	Elemento	Concentración (mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
NaNO ₃	1.5	Nitrógeno (NO ₃ , NH ₄ ⁺ ratio 2.8:1)**	114.7	N	247.07	247.07
K ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	0.04	Potasio (K ₂ O)	60	K	8.97	129.24
		Fosforo (P ₂ O ₅)	80	P	17.96	172.32
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.075	Magnesio (Mg)	0.25	Mg	7.40	129.24
		Azufre (S)	1.5	S	9.76	3.23
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.036	Calcio (Ca)	0.25	Ca	9.81	0.54
Ferric Ammonium Citrate	0.036	Hierro (Fe)	0.2	Fe	1.28	1.08
Na ₂ CO ₃	0.02	NR	--	C	2.26	0.00
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0.001	NR	--	--	--	--
Citric acid	0.036	NR	--	--	--	--
Metales						
H ₃ BO ₃	2.86 mg	Boro (B)	0.4	B	0.50	0.86
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81 mg	Manganeso (Mn)	0.4	Mn	0.50	0.86
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22 mg	Zinc (Zn)	0.8	Zn	0.05	1.72
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.39 mg	Molibdeno (Mo)	0.05	Mo	0.17	0.11
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.079 mg	Cobre (Cu)	0.4	Cu	0.02	0.86
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	49.4 µg	Cobalto (Co)	0.2	Co	0.01 µg	0.43
Vitaminas and Hormonas						
		Tiamina hydrochloride	0.04		0.00	0.09
		Ácido indolacético	0.03		0.00	0.06

*Concentrado de Bayfolan Forte.

**Datos reportados por Fernández-Linares et al., 2021.

***Disponibilidad de la Fuente de Nitrógeno ajustada al mismo valor que el medio mineral BG-11.

6.3.2 Fotobiorreactores

La **Figura 6.2** muestra las diferentes configuraciones de fotobiorreactores utilizados. Se utilizó un sistema RWP, para evaluar el crecimiento de la microalga con fertilizante foliar en condiciones a la intemperie. Los experimentos para la evaluación de la eliminación de los gases de combustión se realizaron en un fotobiorreactor híbrido (FBRH).



Figura 6.2. Fotobiorreactores para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM a) RWP y b) FBRH

Las características y especificaciones de cada sistema están descritas en las secciones 3.4.4 y 3.4.5

6.3.3 Sistemas RWP y FBRH operados en la intemperie.

Los experimentos con los sistemas RWP y FBRH fueron realizados en la intemperie en los periodos de otoño e invierno en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, en la Ciudad de México (latitud: 19° 21' 41" N; y longitud: 99° 04' 22" W). Se evaluó el crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM utilizando Bayfolan forte. En el sistema RWP se tuvo una biomasa inicial de 0.1 g L⁻¹ y en el sistema FBRH de 0.05 g L⁻¹.

6.3.4 Gases de combustión

Los gases de combustión fueron obtenidos de una corriente real generada a partir de un generador de energía portátil de 3 kVA (Genarac modelo LP3250). Este generador utiliza como fuente de combustible gas LP. Los gases generados por este equipo fueron colectados en bolsas Tedlar de 50 L y su composición fue analizada con un analizador de

gases de combustión portátil (NOVA modelo 5006) que tiene la capacidad de medir simultáneamente la composición de los gases O₂, CO, CO₂, SO₂, NO y NO₂.

6.3.5 Evaluación del quitosano para la recuperación de la biomasa microalgal.

La evaluación de la recuperación de la biomasa microalgal se realizó utilizando un polímero catiónico como lo es el quitosano agroindustrial (VEPIMSA foods), el cual induce la floculación. El quitosano se diluyó en una solución de HCl (0.5 N), se evaluaron diferentes concentraciones (15, 30, 45 y 60 mg_{quitosano} L⁻¹) para obtener la solución de quitosano. Se realizó una prueba de jarras para determinar la mejor concentración de quitosano, estas pruebas se realizaron con un volumen de cultivo microalga de 0.5 L que tenían una concentración de 1.4 g L⁻¹, con cultivo fresco en fase exponencial, esto es de gran importancia debido que las propiedades del cultivo pueden cambiar debido al tiempo de almacenamiento, temperatura y pH. Durante la adición del floculante el medio de cultivo con microalgas fue mezclado intensamente (400 rpm) durante 2 minutos y posteriormente se agito lentamente (200 rpm) por 5 minutos. La suspensión se dejó sedimentar, se muestreo el sobrenadante en el centro de la zona del clarificado y se midió la absorbancia a 650, 580 y 775 nm a diferentes tiempos (Lama et al., 2016).

6.3.6 Estrategias para la evaluación del acondicionamiento de una corriente de gases de combustión.

6.3.6.1 Evaluación del crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM con medio de cultivo alternativo.

Se evaluó el uso de fertilizante foliar como fuente de nutrientes para el cultivo de la microalga y el efecto de las condiciones ambientales sobre la productividad de la biomasa.

El cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM fue evaluado en dos formas de operación del reactor lote y lote alimentado. Para la operación en lote, el reactor fue inoculado con una cantidad microalga suficiente para tener una concentración inicial de 0.2 g L⁻¹, aireación de 1 L min⁻¹ aire, el tiempo de operación del RWP fue de 25 días durante el periodo de verano.

La operación en semi-continuo se llevó a cabo inicialmente de la misma forma que la operación en lotes, pero al estar la microalga en fase exponencial con una concentración

cercana a 1 g L^{-1} se retiraban 700 L cada aproximadamente cada 20 días, se monitoreaba la biomasa y el consumo de nitratos. Por último, se evaluó el uso de quitosano como floculante para la recuperación de la biomasa microalgal. El tiempo total de estos experimentos fue de 120 días que compren las estaciones de verano, otoño e invierno.

6.3.6.2 Acondicionamiento de una corriente real de gases de combustión

El acondicionamiento de la corriente de gases de combustión se realizó en 4 etapas I) alimentación de 100 mL min^{-1} gas de combustión, II) alimentación de 100 mL min^{-1} de aire, III) alimentación de 500 mL min^{-1} de aire, IV) alimentación de 300 mL min^{-1} gas de combustión y V) operación en semicontinuo con alimentación de 300 mL min^{-1} gas de combustión. Estas etapas muestran la operación del sistema a partir del mes de abril hasta el mes de diciembre.

6.3.7 Métodos analíticos

6.3.7.1 Análisis de la biomasa

La concentración de biomasa, contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofilas en la biomasa en el medio de cultivo fueron evaluados de acuerdo con lo reportado en la sección 3.5.

6.3.7.2 Parámetros cinéticos

La tasa específica de crecimiento (μ , d^{-1}), la productividad de biomasa (P_b , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), eficiencia fotosintética (PE, %) y el rendimiento cuántico de lípidos ($g_{lip} \text{ mol}_{foton}^{-1}$) fueron calculados de acuerdo con lo reportado en la sección 3.6.

6.4 Resultados

En esta sección se presentan los resultados y discusión de los diferentes estudios experimentales realizados.

6.4.1 Evaluación del crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en un sistema RWP.

La evaluación del cultivo de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM se realizó utilizando un estanque tipo RWP operado en la intemperie con la finalidad de observar las

diferencias cuantitativas en el crecimiento en diferentes periodos estacionales que están relacionados con los periodos de exposición a la luz y la temperatura principalmente (ciclos circadianos)

Se realizó una prueba en lote para evaluar la productividad de la biomasa en la **Figura 6.3** se observa que la microalga es capaz de alcanzar una biomasa máxima de 0.5 g L^{-1} en un periodo de 23 días. Además, la microalga es capaz de asimilar los nutrientes suministrados por el fertilizante foliar logrando alcanzar una productividad máxima de $2.5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y una μ de 0.043 d^{-1} .

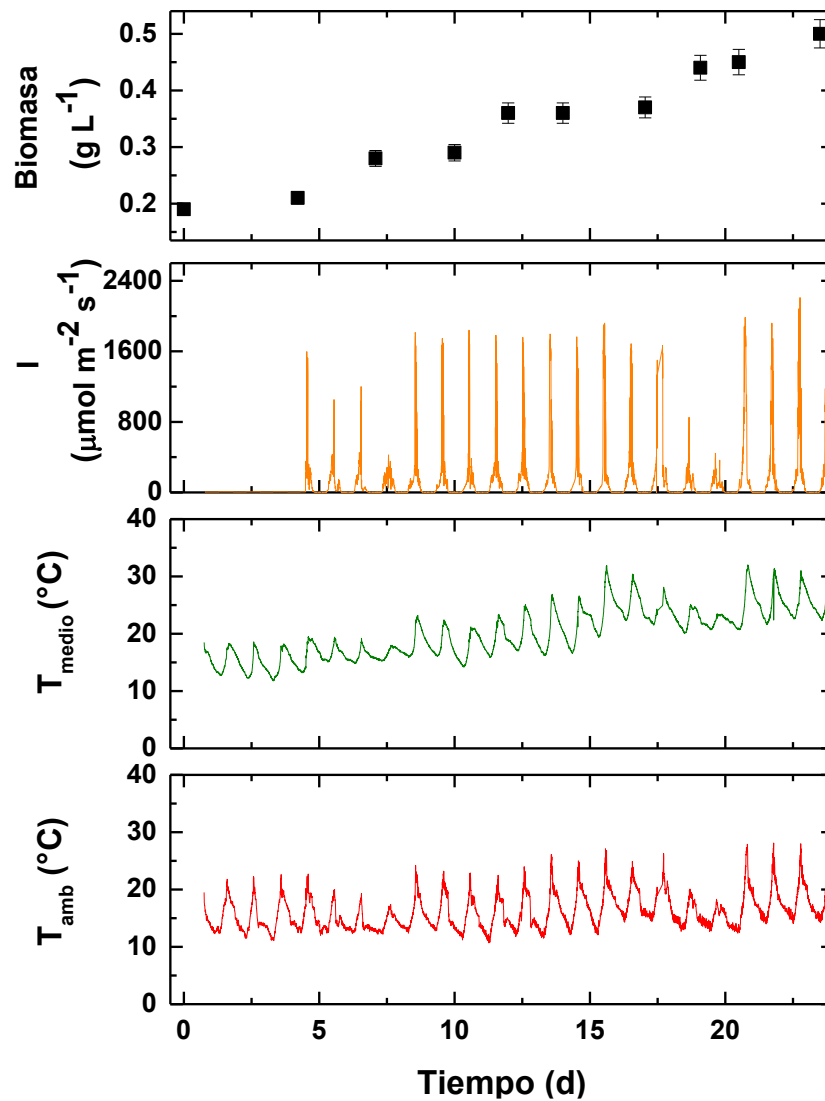


Figura 6.3. Crecimiento de *S. obtusiusculus* AT-UAM en un RWP en la intemperie.

El cultivo de microorganismos fotosintéticos depende principalmente de la cantidad de luz recibida por las células y la temperatura pues tienen una relación directa con la capacidad para fijar el CO₂ por medio de la fotosíntesis y por lo tanto determina la productividad de la biomasa y la tasa de crecimiento.

Cuando se realizan los cultivos a la intemperie la temperatura juega un rol importante, en la **Figura 6.3** se muestra los perfiles de temperatura en el medio de cultivo y en el ambiente observándose que en el medio de cultivo la temperatura es mayor debido a que el RWP cuenta con un controlador temperatura que ayuda a compensar las bajas temperaturas y mantiene la temperatura del cultivo entre 5-10°C por encima de la temperatura ambiente.

Como se observa en la **Figura 6.4**, la irradiancia máxima de luz fue de 2400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sin embargo esta irradiancia solo se presenta en periodos cortos de tiempo, haciendo una revisión más detallada de los perfiles de irradiancia, cuando se observa el comportamiento en un día se puede ver que existen grandes variaciones y que el promedio de irradiancia que llega al cultivo es entre 500-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un periodo de 9.5 horas cada día.

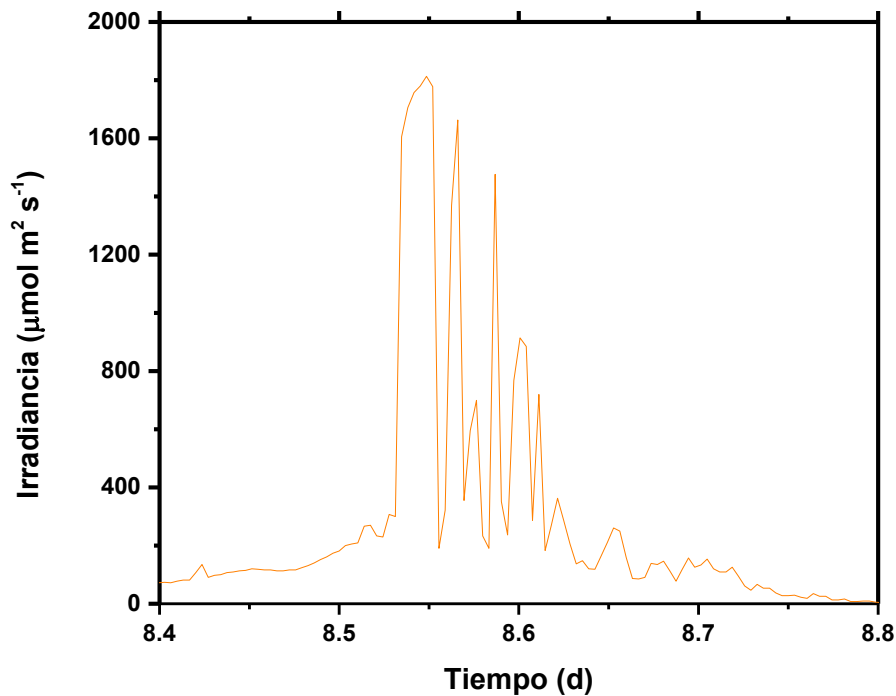


Figura 6.4. Irradiancia en el medio de cultivo.

6.4.2 Perfil bioquímico

En la **Figura 6.5** se muestran la evolución del perfil bioquímico o análisis proximal de la biomasa microalgal incluyendo, proteínas, carbohidratos (CHO), lípidos, clorofilas y el contenido inorgánico. Al comparar los elementos que contiene el medio mineral BG-11 y el Bayfolan forte (**Tabla 6.1**), se observa que las composiciones son muy similares por lo que se espera un comportamiento del perfil bioquímico similar a lo reportado en la literatura. (Cabello et al., 2015), reporta que bajo las mejores condiciones de operación el perfil bioquímico es carbohidratos 21.3%, proteínas 52.4%, clorofilas 2.3% y lípidos 14.2%, un perfil similar al reportado en este trabajo. Sin embargo, debido a la naturaleza del sistema es necesario evaluar el contenido inorgánico que se encuentra en el medio de cultivo pues este puede representar una fracción significativa de la biomasa y debe de ser considerado en la cuantificación final.

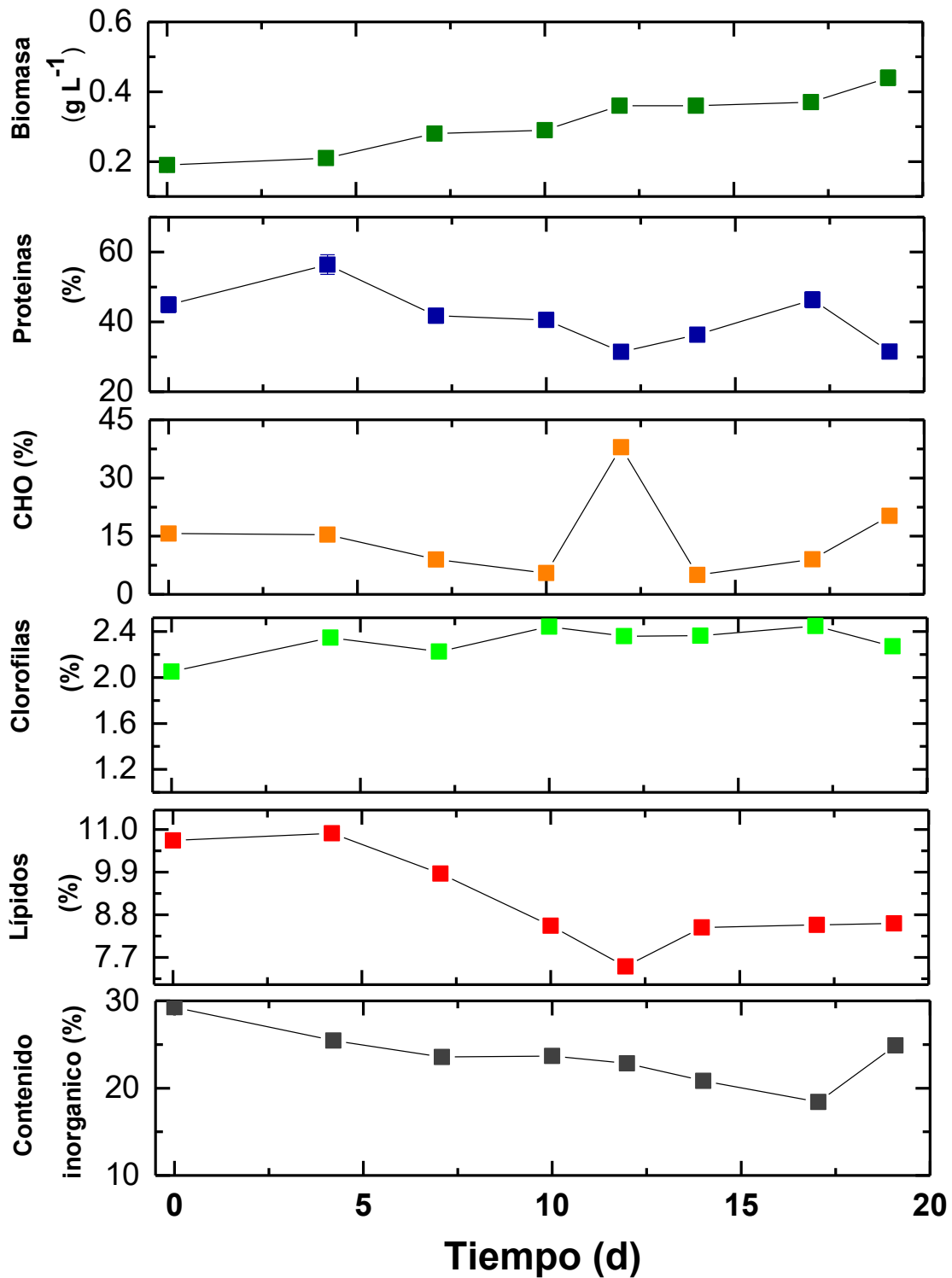


Figura 6.5. Perfil bioquímico de *Scenedesmus obtusiusculus*.AT-UAM cultivada en un RWP en condiciones de crecimiento.

6.4.3 Operación del RWP en semi-continuo

Uno de los aspectos más importantes que se deben estudiar para aumentar la productividad del sistema es el régimen de alimentación. Donde el cultivo puede mantenerse de forma intermitente (semicontinuo) mediante la cosecha periódica de la microalga y agregando medio fresco. En esta sección se realizó la operación en un régimen de semi-continuo. El RWP fue inoculado con una biomasa inicial de 0.2 g L^{-1} con medio Bayfolan forte y se inició la operación en lote alimentado cuando la concentración de la biomasa se encontraba cercana a 0.5 g L^{-1} en la etapa I y a 1 g L^{-1} en las etapas II y III. La concentración del cultivo tiene gran importancia cuando se desea evaluar los diferentes regímenes de operación, debido a que una alta concentración genera mayores zonas de oscuridad dentro del sistema por lo tanto las microalgas se encuentran limitadas de la fuente de luz. Una vez que el cultivo se encontró dentro del intervalo de concentración de biomasa mencionado anteriormente, se retiraron 700 L del RWP y se agregaron 700 L de medio fresco.

En la **Figura 6.6** se encuentran representadas las alimentaciones que se realizaron durante 93 días en los periodos de verano y otoño.

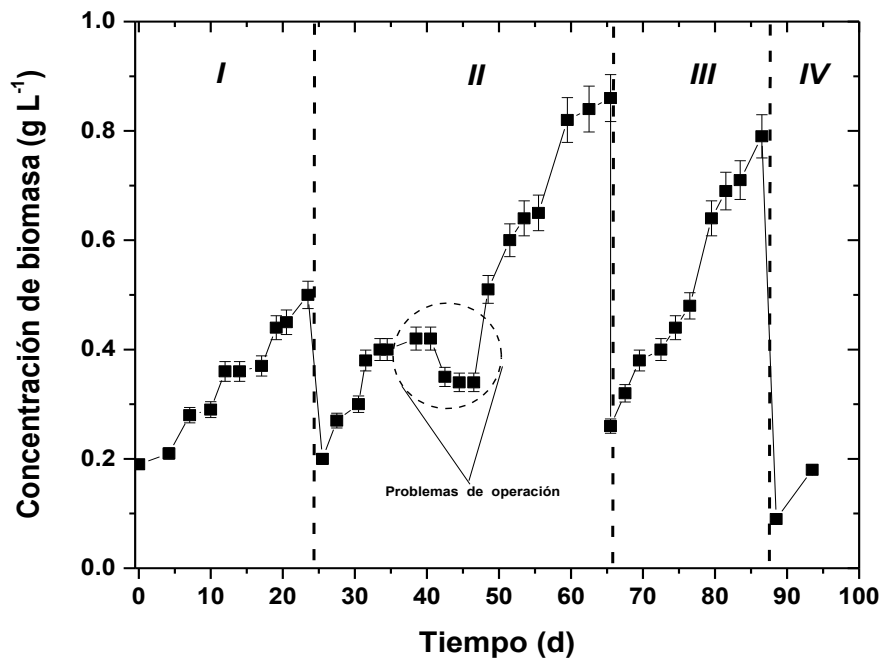


Figura 6.6. Operación en semi-continuo del RWP

En la **Tabla 6.2**, se muestra un resumen de los parámetros de crecimiento y captura de CO₂, los resultados de las diferentes etapas.

Tabla 6.2. Parámetros de operación del sistema RWP.

Parámetro	Etapas I	Etapas II	Etapas III
C _{b,max} (g L ⁻¹)	0.50	0.86	0.79
P _{b,max} (g m ⁻² d ⁻¹)	2.5	14.70	14.50
P _{CO2} (g m ⁻² d ⁻¹)	4.67	27.48	27.11
μ (d ⁻¹)	0.042	0.057	0.067
t _d (d)	16.50	12.16	10.34

6.4.4 Evaluación del crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en un sistema híbrido.

Como se puede observar en la **Figura 6.7**, se indican 4 etapas que representan I) alimentación de 100 mL min⁻¹ gas de combustión, II) alimentación de 100 mL min⁻¹ de aire, III) alimentación de 500 mL min⁻¹ de aire, IV) alimentación de 300 mL min⁻¹ gas de combustión y V) operación en semicontinuo con alimentación de 300 mL min⁻¹ gas de combustión. Estas etapas muestran la operación del sistema a partir del mes de Abril hasta el mes de Diciembre.

En la **Figura 6.7** se muestran las curvas de crecimiento para *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM bajo diferentes condiciones. Como se observa, las concentraciones mayores de biomasa se obtuvieron con 300 ml min⁻¹ de gas de combustión (aproximadamente 0.4 g L⁻¹, en 13 días). De igual manera en la **Tabla 6.3** se puede notar que la productividad más alta es en la operación en semicontinuo (123 mg L⁻¹ d⁻¹), sin embargo, la tasa específica de crecimiento específica fue similar durante toda la etapa V (**Tabla 6.3**).

En estos experimentos el pH incrementa a lo largo del periodo de cultivo donde el rango en que se mantuvo fue de 8.1-9.8. La irradiancia máxima alcanzada fue de 2030 μmol m⁻² s⁻¹ con temperaturas promedio en el medio de cultivo entre 10.5 y 29.2°C.

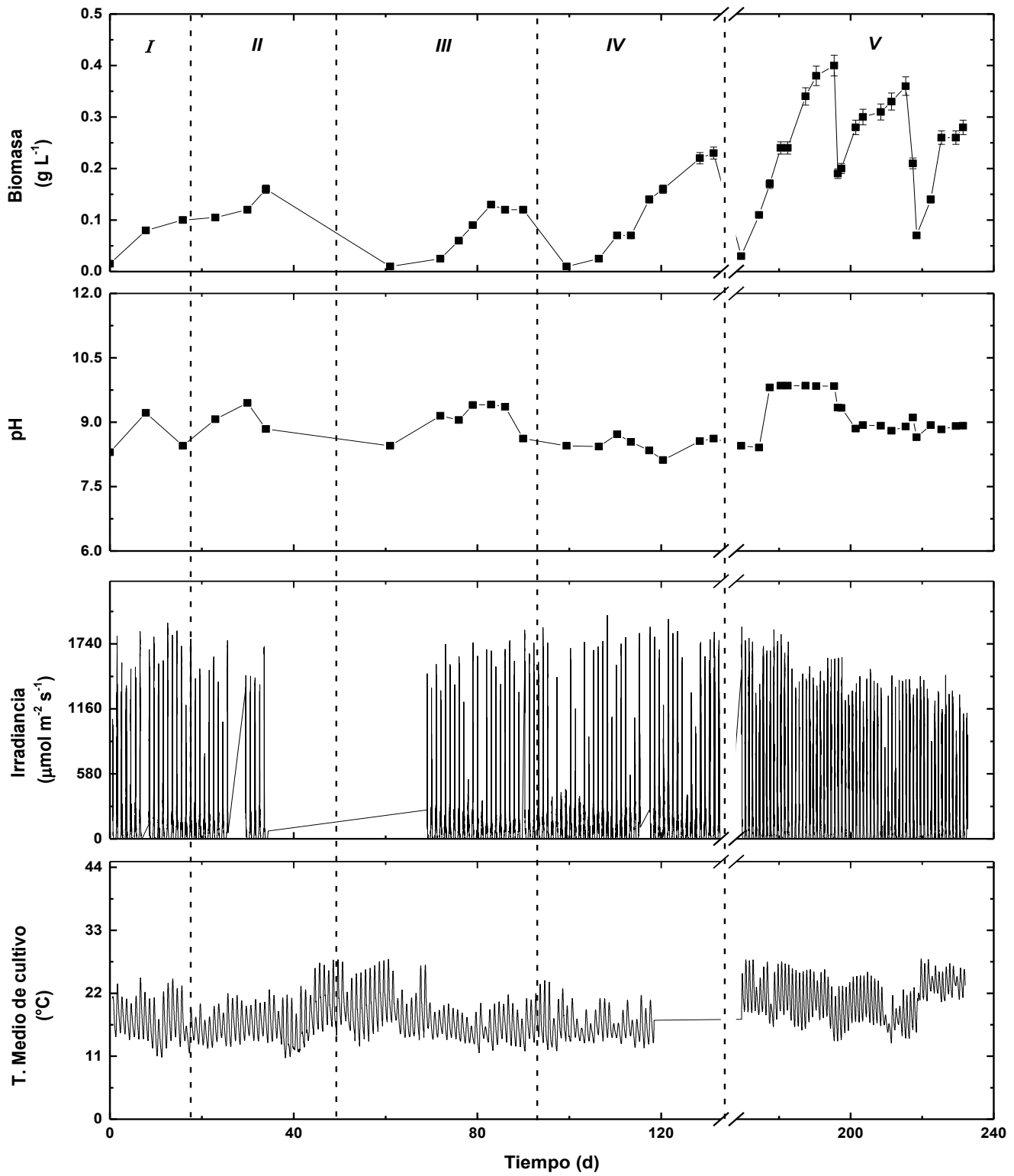


Figura 6.7. Cinética de crecimiento reactor híbrido con aire.

Debido a que en la mayoría de los experimentos se suministró un flujo de gas de combustión que contiene en promedio 4.5 % de CO₂ se observa una dinámica de contenido de carbono entre la biomasa y el medio de cultivo. En la **Figura 6.8** se puede observar cómo es la distribución del carbono alimentado, donde la mayor fracción se encuentra en la biomasa. Además, se observa que conforme va pasando el tiempo de cultivo, el carbono inorgánico se va acumulando en el medio de cultivo. Sin embargo, la fracción de carbono en el medio de cultivo es baja. Así mismo, los valores de pH se mantuvieron en un rango de 8.1-9.8, a pesar de la adición de los gases de combustión donde se pudiera esperar una ligera acidificación debido a la alimentación de CO₂ en el gas de combustión.

Como se mencionó anteriormente se analizó la corriente de entrada y de salida de gas, y se observó que la eliminación de los gases de combustión es del 100% durante todas las etapas en que fue alimentado.

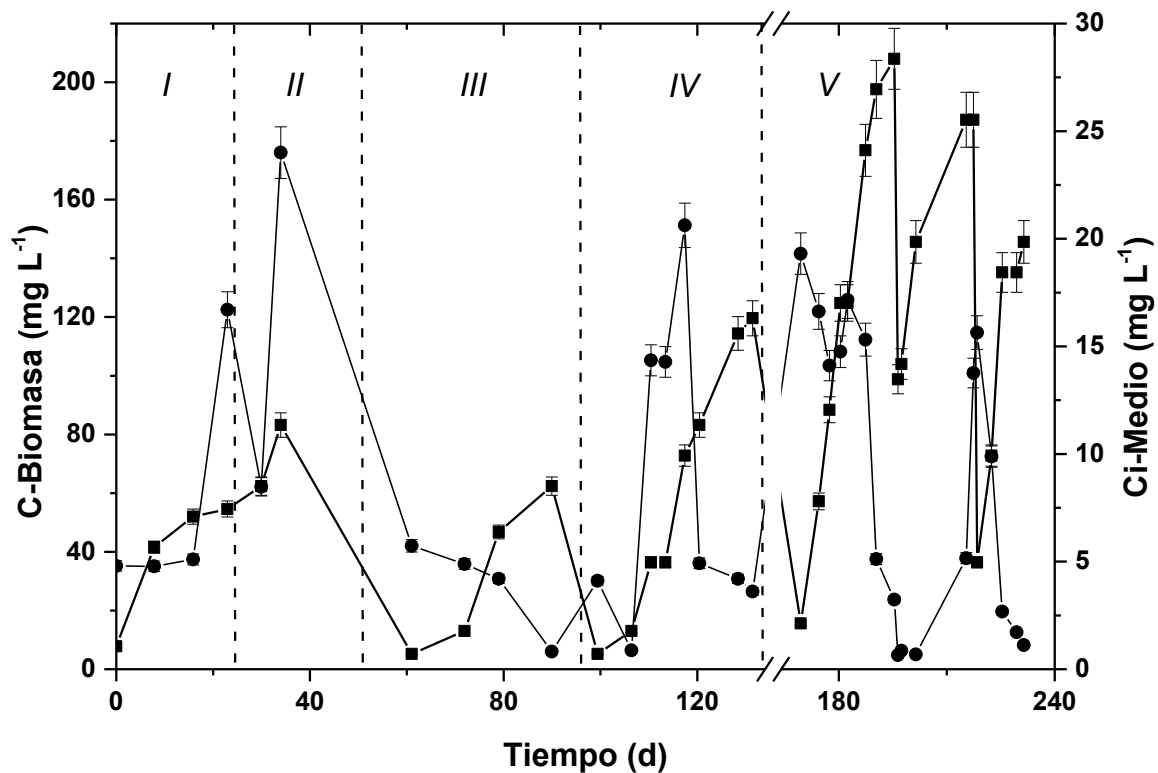


Figura 6.8. Fijación del Carbono, Carbono fijado en la biomasa (▪), carbono inorgánico fijado en el medio de cultivo (•).

Tabla 6.3. Condiciones de cultivo, remoción de gases, parámetros de crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en un sistema híbrido alimentada con gas de combustión.

Parámetro	100 mL _{gas} min ⁻¹ de gas de combustión	100 mL min ⁻¹ de Aire	500 mL min ⁻¹ de Aire	300 mL min ⁻¹ de gas de combustión	Semicontinuo 300 mL min ⁻¹ de gas de combustión		
Tiempo de operación	11 d	16 d	29 d	32 d	29 d	21 d	13 d
Periodo	Primavera	Verano	Verano	Verano	Otoño	Otoño	Otoño
pH	9.0-9.4	8.3-8.4	8.4-9.4	8.4-8.7	8.4-9.8	8.3-9.1	8.6-9.2
Gas de entrada	CO ₂ , 4.5%, NO ₂ , 21 ppm, SO ₂ , 1ppm*	0.04%CO ₂	0.04%CO ₂	CO ₂ , 4.5%, NO ₂ , 7ppm, SO ₂ , 3 ppm*	CO ₂ , 4.5%, NO ₂ , 7ppm, SO ₂ , 3 ppm*		
Remoción de los gases							
CO ₂ (%)	100	100	100	100	100	100	100
NO ₂ (%)	100	--	--	100	100	100	100
SO ₂ (%)	100	--	--	100	100	100	100
Parámetros de crecimiento							
C _{b,max} (g L ⁻¹)	0.16	0.10	0.12	0.23	0.40	0.36	0.3
P _{b,max} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	3.2	10.05	11.09	10.52	15.89	57.31	123.06
P _{b,max} (mg m ⁻² d ⁻¹)	481.08	1508.23	1663.71	1577.68	2383.50	8596.50	18459.00
P _{CO2} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	6.00	18.80	20.74	19.67	29.71	107.17	230.12
P _{CO2} (mg m ⁻² d ⁻¹)	899.62	2820.39	3111.13	2950.26	4457.15	16075.46	34518.33
μ (d ⁻¹)	0.10	0.16	0.11	0.14	0.17	0.16	0.16
Parámetros Bioquímicos							
Proteínas (%)	58.25	57.21	60.58	61.54	47.40	59.52	61.13
Carbohidratos (%)	11.25	10.18	10.79	15.33	12.84	17.06	13.30
Lípidos (%)	9.24	10.50	11.24	10.14	11.81	10.01	9.86
Clorofilas (%)	0.63	0.57	0.74	0.81	0.85	0.42	0.45
Cenizas (%)	16.52	17.94	18.62	17.86	16.78	16.93	17.21

*Los datos de la corriente de entrada son los promedios de los obtenidos cada vez que se recargaban las bolsas con gas de combustión.

En la **Tabla 6.3** se muestra los parámetros cinéticos de los experimentos, además se muestra el perfil bioquímico de la biomasa en cada etapa. Donde el perfil bioquímico promedio en todas las etapas fue 57.94 % Proteínas, 12.9 % Carbohidratos, 10.4 % Lípidos, 0.63 % Clorofilas y 17.4 % de Cenizas.

Scenedesmus obtusiusculus AT-UAM mostró su gran capacidad para la eliminación de los gases de combustión a lo largo del cultivo, además cuando el sistema fue operado en semicontinuo se observó la mayor productividad de biomasa siendo de $123 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

6.4.5 Recuperación de la biomasa con quitosano.

En la **Figura 6.9** se muestra la evaluación de la eficiencia de floculación con quitosano y se puede observar que con concentraciones mayores a 45 mg L^{-1} , permiten obtener una floculación por arriba del 90%. Sin embargo, para lograr esta floculación en un periodo corto de tiempo es necesario agregar 60 mg L^{-1} para lograr la floculación del 90% en los primeros 20 minutos.

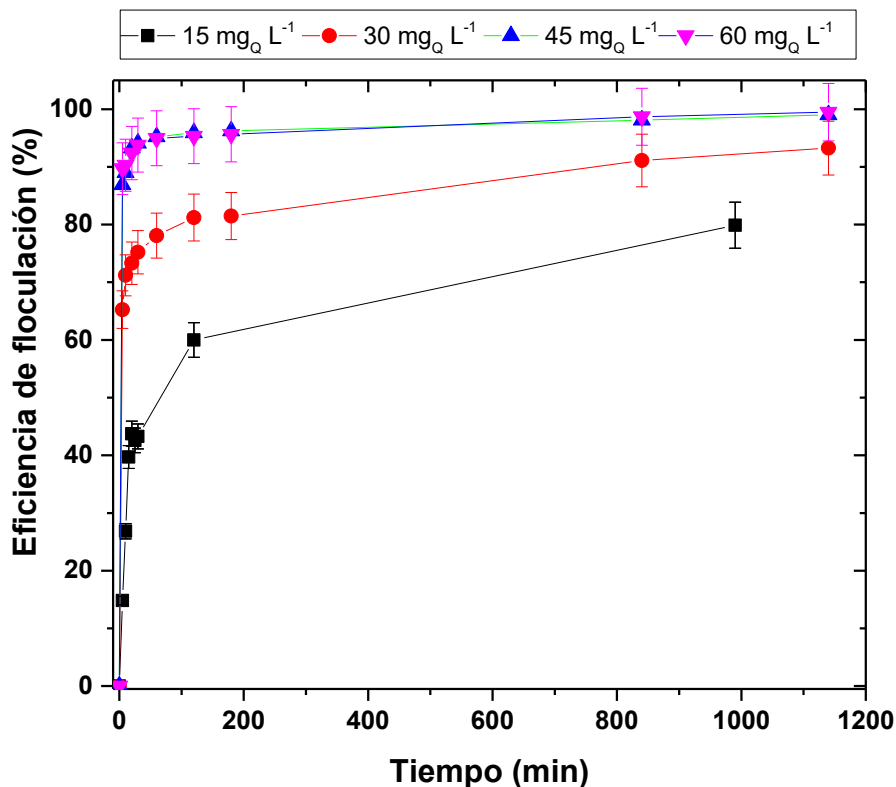


Figura 6.9. Evaluación de la eficiencia de floculación con quitosano.

Al comparar los resultados con los reportados en la bibliografía (**Tabla 6.4**), se observa que son muy similares a los obtenidos con la misma especie de microalga. Para la recuperación de la biomasa durante esta parte del proyecto se realizó utilizando 60 mg_{quitosano} L⁻¹ medio de cultivo.

Tabla 6.4. Comparación de la cantidad de floculante para diferentes especies de microalgas. Adaptado de (Lama et al., 2016).

Microalga	Quitosano	
	x_b (mg L ⁻¹)	Y_{max} (%)
<i>Pseudanabaena</i> CY14-1	79 ± 2	92 ± 3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.23 ± 0.01	99.0 ± 0.5
<i>Scenedesmus obliquus</i>	61 ± 18	88 ± 3
<i>Phaeodactylum 1</i>	96 ± 26	84 ± 4
<i>Phaeodactylum 2</i>	94 ± 21	86 ± 2
<i>Diacronema lutheri</i>	*	97.4 ± 0.8
<i>Tetraselmis suecica</i>	17.1 ± 0.7	93 ± 4
<i>Nannochloropsis oculata</i>	*	95 ± 3
<i>Dunaliella salina</i>	40 ± 2	85 ± 2
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	60	99

6.5 Conclusión

La microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM mostró una alta capacidad de adaptación y productividad al cultivarse en la intemperie, tanto en sistemas RWP como en un reactor híbrido alimentado con gases de combustión. El control de temperatura en el medio de cultivo permitió alcanzar una productividad máxima de 14.7 g m⁻² d⁻¹, cuando fue operado en semicontinuo, por otro lado, el sistema híbrido alcanzó una productividad de 123 mg L⁻¹ d⁻¹. Asimismo, el perfil bioquímico de la microalga mostró mantenerse estable, con un porcentaje alto de proteínas.

En cuanto a la recuperación de biomasa, la utilización de quitosano como floculante resultó altamente eficiente, logrando más del 99 % de recuperación a concentraciones de 60 mg_{quitosano} L⁻¹. Además, *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM mostró un destacado potencial para la remoción de gases de combustión (CO₂, NO₂ y SO₂), alcanzando tasas

de eliminación del 100 %, lo que posiciona a esta microalga como una candidata idónea para estrategias de biomitigación de gases de efecto invernadero.

Los resultados obtenidos resaltan el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM para aplicaciones en biofijación de carbono y producción sostenible de biomasa, favoreciendo su integración en sistemas de tratamiento de gases combustión y obtención de bioproductos de alto valor agregado.

Capítulo 7. Evaluación Tecno-Económica para la implementación de una biorrefinería para la producción de lípidos y pigmentos a partir de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM.

7.1 Resumen

Este estudio evaluó un sistema integrado para la producción conjunta de luteína y biodiesel utilizando la cepa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. El proceso consta de cuatro etapas principales: (1) cultivo en 5 raceway ponds de 202 m³ cada uno con alimentación continua de CO₂ y medio mineral BG-11, (2) concentración de biomasa mediante centrifugación (99.99% eficiencia) y homogenización, (3) extracción con solventes (cloroformo-metanol 2:1) y saponificación, y (4) purificación final por filtración rotatoria (99.99% eficiencia). La simulación en SuperPro Designer v10®, basada en una producción de 104 kg d⁻¹ de biomasa, requirió un área total de 0.34 hectáreas. La composición de la biomasa mostró 18% lípidos 31.94% proteínas y 0.06% LFAE. El análisis económico reveló una inversión inicial de USD 19 millones, con costos operativos anuales de USD 15 millones USD. La producción de luteína alcanzó 12.14 kg año⁻¹, pero con un elevado costo unitario de USD 1.2 millones kg⁻¹ debido al bajo rendimiento del pigmento (0.06% en biomasa). Sin embargo, la valorización conjunta del biodiesel (FAMES) y subproductos generó ingresos adicionales, logrando un margen bruto del 17.42 %, TIR del 8.36 % y período de recuperación de 5.45 años. Los principales cuellos de botella identificados fueron la baja productividad de luteína y los altos costos de separación.

7.2 Introducción

Las microalgas representan una fuente de materias primas prometedora, desde la producción de biodiesel hasta la producción de proteínas y compuestos bioactivos, bajo un enfoque sostenible que coadyuve a satisfacer la creciente demanda global de energías renovables, alimentos y otros productos de valor (Ansari et al., 2017). Sin embargo, para garantizar la viabilidad económica, las biorrefinerías de microalgas deben de evolucionar más allá del sistema monoproducción (centrado principalmente en biodiesel) y adoptar estrategias donde se integren múltiples productos (Yadav et al., 2019). Además, representan una alternativa sostenible y prometedora para la remediación de aguas residuales, la captura de CO₂ de gases de combustión y la producción de diversos productos de alto valor, como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, exopolisacáridos, antioxidantes y vitaminas (Sarma et al., 2021). La luteína, uno de los

carotenoides comercialmente más relevantes, ha cobrado mayor interés debido a sus múltiples aplicaciones en el cuidado de la salud, incluyendo la prevención y mejora de la degradación macular relacionada con la edad, cataratas, ciertos tipos de cáncer y aterosclerosis (Iwamoto et al., 2024). Se ha reportado que las cepas de los géneros, *Chlorella*, *Desmodesmus* y *Scenedesmus* tienen un alto potencial para la producción de lípidos y la co-producción de pigmentos de alto valor agregado como la luteína (Muhammad et al., 2024b).

Como cualquier otro microorganismo, las microalgas necesitan condiciones de cultivo adecuadas para crecer. De manera general, los sistemas de cultivo de microalgas se clasifican en dos clases: sistemas abiertos y sistemas cerrados. Los sistemas de cultivo cerrados, también denominados fotobiorreactores (FBR), se encuentran aislados del ambiente exterior y sin contacto directo con la atmósfera (Wang et al., 2012). Su implementación a gran escala es menos frecuente que los sistemas abiertos debido a que su escalamiento no es tan sencillo además de que la construcción, mantenimiento y operación de estos sistemas implican un elevado costo. Los sistemas de cultivo abiertos son aquellos en los que la biomasa está expuesta a las condiciones ambientales y son los más empleados para la producción comercial de microalgas debido a que son sistemas fácilmente escalables, de fácil operación y relativamente baratos (existen, por ejemplo, estanques circulares y estanques de pista o raceway pond). Típicamente estos estanques se mantienen poco profundos (50 cm máximo) para asegurar la penetración de luz al medio de cultivo y aumentar la transferencia de masa de CO₂. A estas profundidades, es posible alcanzar concentraciones de hasta 1 g L⁻¹ de biomasa (Jebali et al., 2018).

Una de las especies que más destaca para la generación simultánea de lípidos y luteína es la del género *Scenedesmus* (Chan et al., 2013; Fu et al., 2023; Rajput et al., 2022). Existen varios reportes de las condiciones óptimas de cultivo tanto a escala laboratorio como en sistemas a gran escala operados en la intemperie que demuestran su robustez y versatilidad operativa. Además, este género se ha estudiado para la captura de CO₂ y producción de lípidos precursores del biodiesel, así como la acumulación de luteína (Cabello et al., 2017, Cabello et al., 2014; Dineshkumar et al., 2015; Toledo-Cervantes et al., 2013). Por lo que, se vuelve relevante para su aplicación bajo el concepto de biorrefinería. Para el desarrollo de un modelo donde se integren los sistemas de cultivo, el procesamiento de la biomasa, la extracción fraccionada y la integración de procesos bajo un diseño de flujos que maximicen el diseño en una plataforma de economía circular.

El objetivo de este estudio fue integrar los datos obtenidos para la cepa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM con la finalidad de simular el escalamiento de un proceso integrado de producción de biodiesel y luteína incorporando la captura de CO₂, proveniente de una corriente de gases de combustión. Con el uso del software *SuperPro Designer V10*, se desarrolló un modelo de biorrefinería que permitió hacer un Análisis Tecno-Económico para evaluar la factibilidad técnica y económica del cultivo bajo el enfoque de una producción sostenible.

7.3 Base de cálculo y metodología

El diseño de un proceso integrado para la producción simultánea de luteína y lípidos para la producción de biodiesel a partir de biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM para la producción de luteína y lípidos. Lo anterior, implica la definición de una serie de etapas con funciones y operaciones específicas, que deberán integrarse en un diagrama de flujo, cuyos balances de materia y energía se utilizarán para hacer el dimensionamiento de la instalación. Cada operación contribuye a los gastos de operación y de capital. Por lo tanto, la realización de un análisis tecno-económico del proceso es un elemento clave para establecer la factibilidad de cualquier proceso o detectar puntos de mejora. La confiabilidad del análisis tecno-económico está determinada por la adecuación y representatividad de las etapas/operaciones seleccionadas y la calidad de los datos utilizados.

7.3.1 Definición de proceso

El proceso general se dividió en 6 secciones principales:

- I) **Sistema de cultivo**, crecimiento de la microalga y concentración de la biomasa generada, utilizando el medio mineral BG-11 y el CO₂ como fuente de carbono.
- II) **Recuperación de la biomasa y ruptura celular**, la biomasa generada cosechada y concentrada. Además, se incluye el paso para la ruptura celular.
- III) **Extracciones con cloroformo/metanol**, a partir de la biomasa lisada se utilizan solventes para recuperar los lípidos y luteína.
- IV) **Fase de reacción y separación I**, en esta fase se realiza una saponificación con KOH de los lípidos para separar los FAMES (metil ésteres de ácidos grasos) y ésteres de luteína.

V) Fase de reacción y separación II (luteína), la luteína se separará de los lípidos utilizando hexano.

VI) Purificación de la luteína, obtención de luteína en forma libre (polvo)

En este estudio se hizo uso de la información experimental obtenida en el Capítulo 6 para la captura de CO₂ y generación de biomasa con la cepa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Además, el diseño del proceso está basado en el trabajo de investigación para la producción simultánea de biodiesel y luteína a partir de microalgas (Prommuak et al., 2019).

Se utilizó la herramienta de simulación de bioprocesos SuperPro Designer v10® para realizar la evaluación de los modelos de producción y el análisis económico. Se configuró todo el proyecto para ser simulado en un régimen continuo.

7.3.2 Sistema de cultivo y recuperación de la biomasa

El sistema consta de 5 estanques abiertos tipo raceway pond (RWP), con 3 corrientes de entrada y una de salida. Las corrientes de entrada alimentan al estanque RWP con agua y los nutrientes necesarios (BG-11), para la generación de biomasa. Por otra parte, el flujo de alimentación gaseosa, cuya composición consta principalmente de CO₂, es transferido al medio líquido para su disposición como fuente de carbono para el crecimiento de la biomasa microalgal. Finalmente, la biomasa producida a partir de tales nutrientes sale del sistema.

Se considera que el volumen de operación del medio líquido es constante a lo largo del tiempo y que existe una tasa de evaporación del 10 L m⁻² d⁻¹. El régimen de alimentación es continuo y se supone en estado estacionario. La alimentación no es estéril, debido a que las condiciones de operación están diseñadas para efluentes residuales, sin embargo, se considera que solo la cepa elegida crecerá en el sistema.

En la **Figura 7.1** se muestra la representación del sistema de cultivo y recuperación de biomasa.

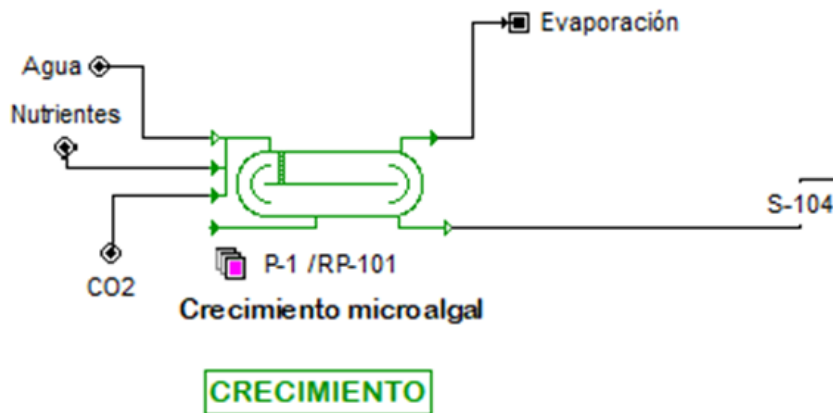


Figura 7.1. Diagrama del sistema RWP para el cultivo de biomasa.

El crecimiento de la biomasa se representó a través de la definición de la estequiometría de una reacción continua en el RWP (ver **Tabla 7.1**). La configuración para el proceso de crecimiento celular se definió usando la información experimental obtenida por el grupo de investigación con microalgas del Capítulo 4, 5 y 6. Se tomó la información de la productividad de ($123 \text{ mg}_{\text{biomasa}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ó $222 \text{ mg}_{\text{CO}_2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de la cepa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM utilizando una corriente de gas de combustión como fuente de carbono (Estrada-Graf et al., 2020).

Tabla 7.1. Parámetros de operación en el reactor RWP.

Parámetros de operación dentro del RWP	
Reacción (másica)	$180 \text{ CO}_2 + 50 \text{ BG11} + 50 \text{ Agua} \rightarrow 100 \text{ Biomasa} + 180 \text{ Oxígeno}$
Conversión de Reacción	100%
Temperatura	isotérmico 25° C
Presión	1 atm
Emisiones (evaporación)	$10 \text{ L Agua m}^{-2} \text{ d}^{-1}$

El tamaño de los sistemas, el área requerida para su instalación y los insumos requeridos se determinaron con base a la cantidad de CO₂ a fijar y la biomasa microalgal a producir y con ello establecer el análisis de costos de operación unitarios. Las dimensiones del sistema de cultivo estarán sujetas a los criterios de diseño definidos en la literatura que permiten un funcionamiento correcto.

7.3.3 Recuperación de la biomasa y ruptura celular

Para la recuperación de la biomasa, se utilizó un equipo de centrifugación y un sistema de homogenización para la ruptura celular (**Figura 7.2**). La eficiencia de la centrifugación se estableció en 99.99% para biomasa, siendo el dimensionamiento calculado mediante el flujo de trabajo. El sistema de homogenización simula el rompimiento celular para la liberación del material orgánico de la célula. La eficiencia de este proceso se estableció en 70%. Para los datos de operación se definió la composición de la biomasa en la siguiente ecuación: lípidos 18%, Proteínas 31.94%, LFAE 0.06%, debris celular 43% y cenizas 7% - > 100% biomasa.

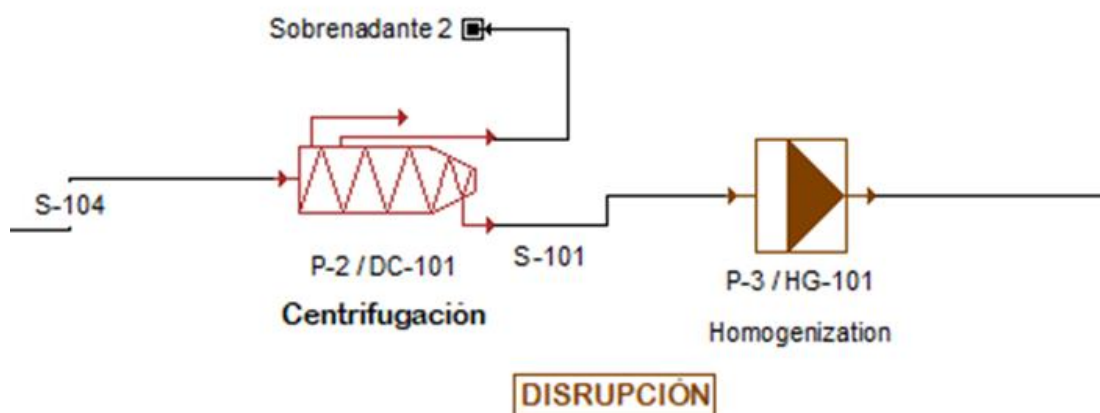


Figura 7.2. Diagrama de la sección de recuperación y ruptura de la biomasa microalgal.

7.3.4 Extracción cloroformo/metanol

La corriente de salida del homogeneizador entra en un equipo donde se mezclará con dos corrientes la primera la mezcla cloroformo/metanol (40:20) y la segunda una corriente de recirculación del evaporador (simulando un proceso similar al shoxlet). Este proceso es adiabático y su tiempo de residencia es de 1 hora. Posteriormente un segundo proceso de centrifugación es llevado a cabo para separar la fase orgánica que contiene el total de los lípidos y más densa con las proteínas y debris celular restante. El último paso de esta sección es un proceso de evaporación para recuperar el solvente y dejar los lípidos en mayor proporción. El porcentaje de evaporación para el cloroformo y el metanol fue de 99 % (**Figura 7.3**).

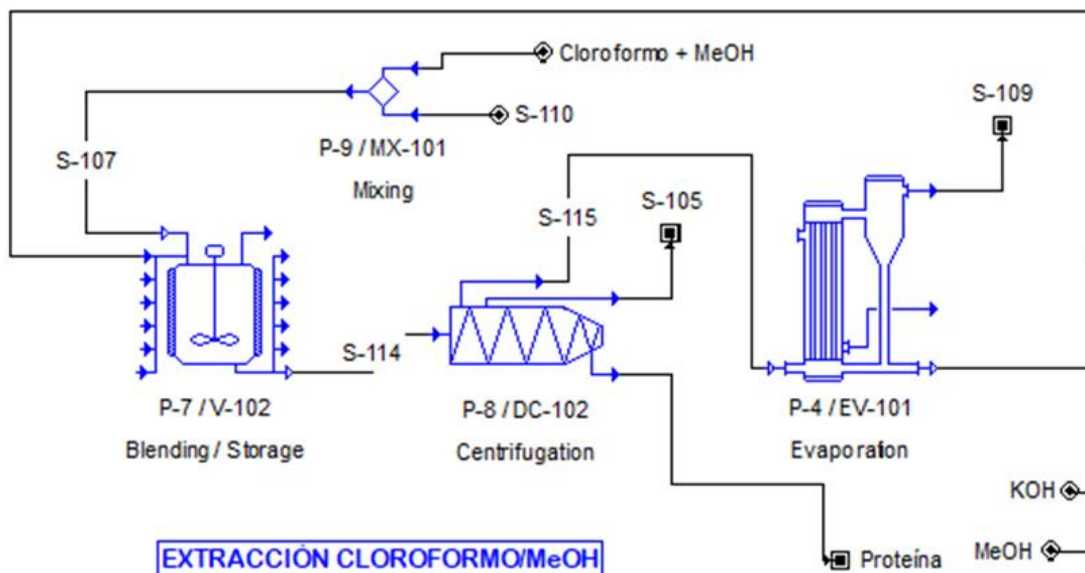


Figura 7.3. Diagrama de la sección de extracción con solventes orgánicos.

7.2.5 Extracción de lípidos y separación de luteína

La siguiente fase comienza con el ingreso de los lípidos crudos a un reactor químico, en el cual se simulo la reacción de saponificación y la conversión de los ésteres de luteína en luteína libre (Figura 7.4).

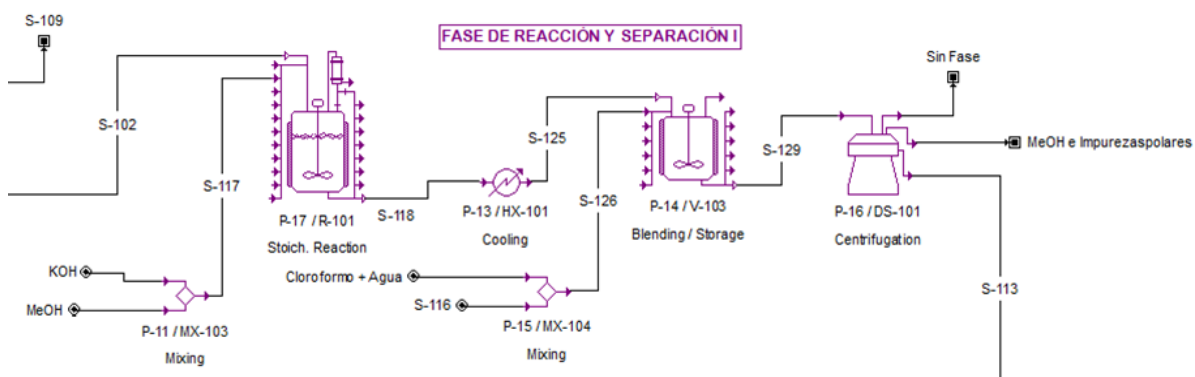


Figura 7.4. Diagrama de la sección de saponificación y separación de las fases orgánica y acuosa.

En los datos de operación se configuró el reactor con un tiempo de reacción de 4 horas (adiabático), con las reacciones másicas de la **Tabla 7.2**.

Tabla 7.2. Parámetros de reacción de extracción/separación

PARÁMETROS DE REACCIÓN	
Reacción 1 (másica)	9.80 Metanol + 90.20 lípidos → 90.20 FAMES + 9.8 Glicerol
Reacción 2 (másica)	8.0 KOH + 92 LFAE → 88 Luteína + 12.0 Jabón
Conversión de Reacción	100%
Temperatura	Isotérmico 25° C
Presión	1 atm

7.3.6 Extracción y separación II

La corriente orgánica que contiene la luteína en su forma libre mezclada con los FAMES entra a un proceso de evaporación, en el cual se recuperará el solvente (cloroformo). A la salida de este proceso entrará en un recipiente en el cual se harán lavados con hexano (fase orgánica) y una solución de agua y etanol (fase acuosa). Un proceso de centrifugación separa la fase orgánica que ha extraído los FAMES. La fase más densa (acuosa) que contiene la luteína en forma libre se utilizará en la sección siguiente. La fase orgánica pasará a un proceso de evaporación en el cual se recuperará el hexano para dejar a los FAMES en mayor composición (**Figura 7.5**).

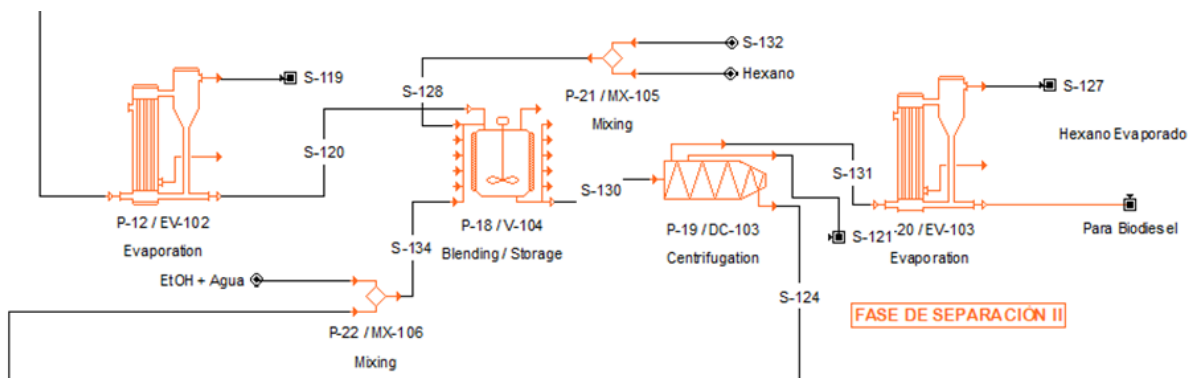


Figura 7.5. Diagrama de extracción y separación.

7.3.7 Purificación de la luteína.

La luteína libre se hidrata en un proceso de almacenamiento, para ser llevado a filtración por rotación al vacío (**Figura 7.6**). En este último paso la luteína es un producto con un porcentaje de humedad de alrededor del 10% (polvo fino).

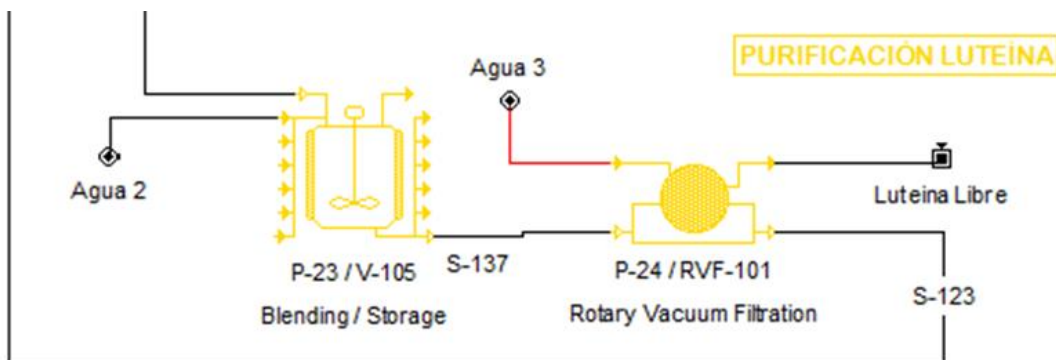


Figura 7.6. Diagrama de la obtención de luteína libre.

7.3.8 Análisis económico.

Una vez concluida la simulación del proceso y habiéndose establecido el dimensionamiento de los equipos del proceso se procedió a hacer el análisis técnico-económico resultante para establecer la viabilidad final del proceso planteado. Para lo anterior se usará la función de generador de reporte económico que incluye el simulador SuperPro Designer v10[®] para obtener los resultados de los parámetros económicos de los diferentes escenarios.

7.3.8.1 Ingresos

Se plantea la posibilidad de utilizar las corrientes de salida de los procesos en los diferentes escenarios para proveer de ingresos económicos que mejoren la rentabilidad del tratamiento. Algunas de las consideraciones abordadas son:

- a) Biodiesel como ingreso. Podemos estimar el costo de los metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) de acuerdo con la literatura en \$ 2.6 USD kg⁻¹ considerando que la producción de biomas es en un RWP (Davis et al., 2011; Pérez-López et al., 2018).
- b) Luteína libre como ingreso. El costo de luteína libre es calculado de acuerdo con la dimensión de la instalación del proceso y de la capacidad de producción. Su costo en el mercado esta acotado a la calidad del producto. Luteína en polvo (\$140-280 USD Kg⁻¹), luteína líquida (\$ 470-670 USD Kg⁻¹) y luteína pura (\$ 1900-2800 USD Kg⁻¹) (Galasso et al., 2017; Muhammad et al., 2024; Yadav et al., 2020).
- c) Mitigación de gases de efecto invernadero. La captura de las emisiones de CO₂ puede ser negociada como ingresos derivados de certificaciones por bonos de carbono (certificaciones comercializadas en el mercado europeo de emisiones

EEX). En donde el precio del mercado es de \$ 9.52 USD ton⁻¹ CO₂ (Gong and You, 2014)

7.4 Resultados y discusión

7.4.1 Diagrama de proceso y dimensionamiento

El tamaño de la instalación se calculó en 0.34 hectáreas (3.4 km²), usando 5 sistemas RWP de 202.92 m³ (100.19 m x 10.13 m x 0.2 m). Los RWP están conectados a una columna de absorción de 3,600 L (0.98 m diámetro x 4 m Altura), la cual absorberá el CO₂ proveniente de la corriente de gas de combustión a un flujo de 8 kg CO₂ h⁻¹ y servirá como fuente de carbono para el crecimiento de la biomasa microalgal. La producción de este sistema es de 4.35 kg Biomasa h⁻¹, cuya corriente entra a la etapa de Recuperación descrita anteriormente (Floculación y Centrifugación) para aumentar su densidad a una concentración de 144.56 g_{biomasa} L⁻¹ (Figura 7.7)

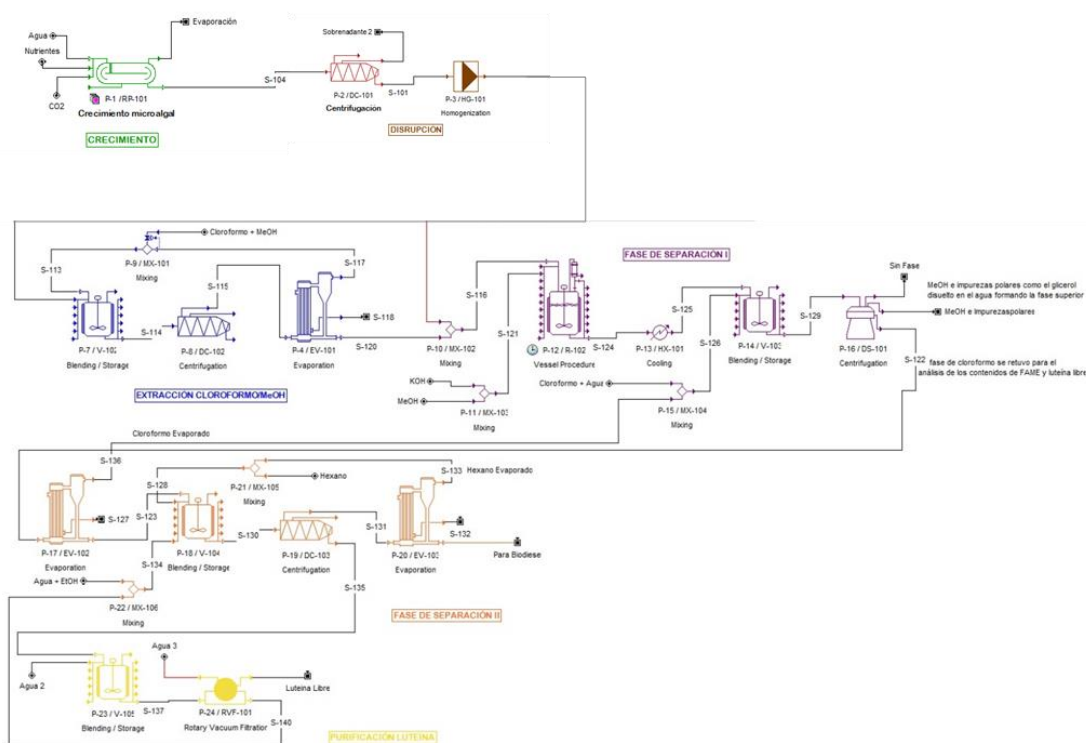


Figura 7.7. Diagrama de proceso para la obtención de luteína y biodiesel.

7.4.2 Evaluación económica

En la **Tabla 7.3** y **Figura 7.8**, se muestra la producción anual de biomasa con las condiciones establecidas; 34.4 toneladas de biomasa microalgal al año para una operación en continuo durante 330 días.

Tabla 7.3. Tiempo de operación y producción anual.

Tiempo Anual Operación (h)	Días de operación por año (d año ⁻¹)	Producción anual de biomasa (ton año ⁻¹)
7,920	330	34.4

Inversión total de capital

En la **Tabla 7.4** se enlistan los equipos considerados para el proceso, su costo unitario y el número de unidades.

Tabla 7.4. Costos de adquisición de equipos.

Cantidad	Código	Descripción	Costo Unitario (\$)	Costo (\$)
5	RP-101	Raceway Pond (202.92 m ³)	10,000	50,000
1	DC-101	Centrifuga/Decantador (1207.78 L/h)	319,000	319,000
1	HG-101	Homogeneizador (19.24 L/h)	28,000	28,000
1	OS-101	Separador de aceites (106.20 L)	12,000	12,000
1	EV-101	Evaporador (0.03 m ²)	133,000	133,000
1	R-101	Reactor agitado (40.50 L)	499,000	499,000
1	HX-101	Intercambiador de calor (0.01 m ²)	10,000	10,000
1	V-101	Tanque de mezclado (77.49 L)	179,000	179,000
1	DS-101	Centrifuga de discos (69.74 L/h)	135,000	135,000
1	EV-102	Evaporador (0.001 m ²)	133,000	133,000

1	V-102	Tanque de mezclado (95.29 L)	179,000	179,000
1	DC-102	Centrifuga/decantador) (76.23 L/h)	319,000	319,000
1	EV-103	Evaporador (0.01 m ²)	133,000	133,000
1	V-103	Tanque de mezclado (12.51 L)	179,000	179,000
1	RVF-101	Filtro rotatorio al vacío (0.04 m ²)	43,000	43,000
		Equipo no enlistado		587,000
			TOTAL	2,935,000

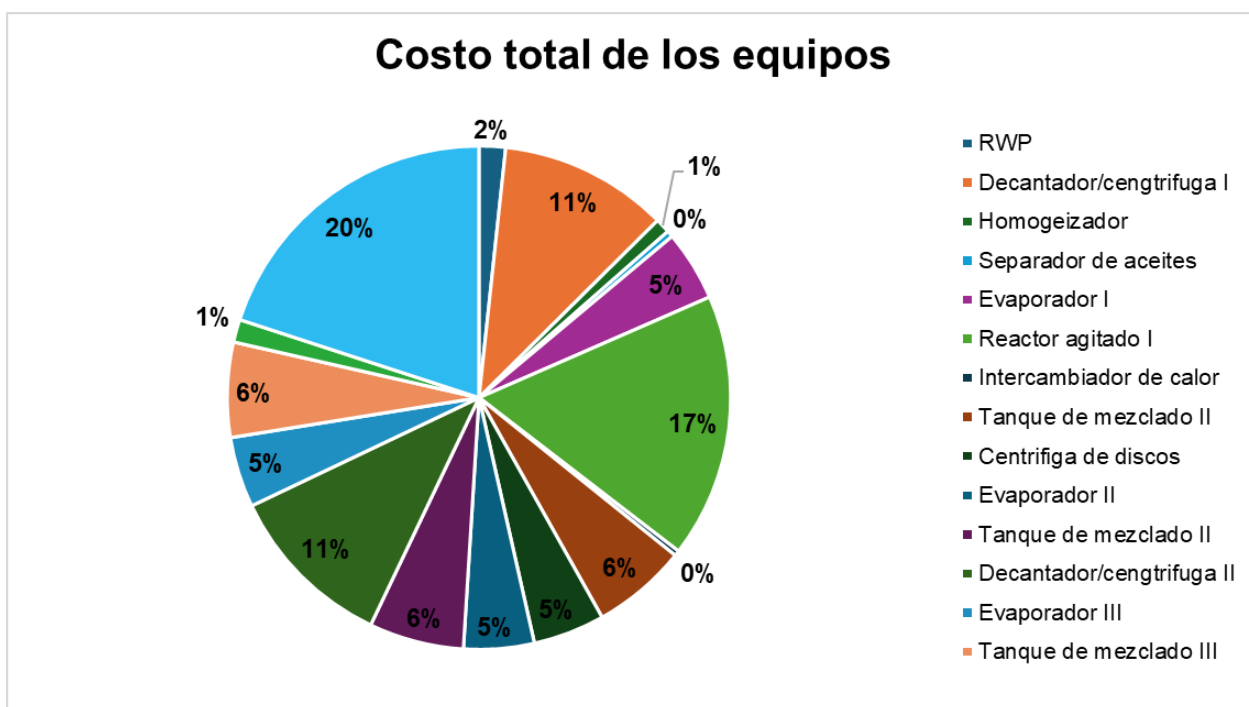


Figura 7.8. Costo de los equipos principales de proceso.

Para el capital fijo se consideró los costos por materiales y mano de obra, instalación más honorarios y contingencias, en las **Tablas 7.5, 7.6 y 7.7** se detallan costos.

Tabla 7.5. Costo directo de la instalación de la planta (USD).

Concepto	Costo (USD)
Costos de compra de equipo	2,935,000
Instalación	1,246,000
Tuberías	1,027,000
Instrumentación	1,174,000
Aislamiento	88,000
Instalación eléctrica	294,000
Edificios	1,321,000
Mejora de patio	440,000
Instalaciones auxiliares	1,174,000
Total	9,699,000

Tabla 7.6. Costo indirecto total de la planta

Concepto	Costo (USD)
Ingeniería	2,425,000
Construcción	3,395,000
Total	5,819,000

Tabla 7.7. Honorarios y Contingencia

Concepto	Costo (USD)
Tarifa de contratista	776,000
Contingencias	1,552,000
Total	2,328,000

Para los costos de operación se consideraron los costos por mano de obra, materia prima, laboratorio y utilidades. En la **Tabla 7.8** se presenta el detalle del costo de mano de obra.

Tabla 7.8. Costos de mano de obra.

Tipo de labor	Costo Unitario (USD /h)	Cantidad Anual (h)	Costo Anual (USD)	%
Operador	69.00	137,469	9,485,331	100

En la **Tabla 7.9** se muestra la distribución de los costos en la suma total de costos de operación.

Tabla 7.9. Costos de operación anual.

Costo de producto	Costo (USD)
Materias Primas	831,000
Dependiente del trabajo	9,485,000
Dependiente de las instalaciones	3,357,000
Laboratorios de control de calidad	1,423,000
Utilidades	32,000
Total	15,127,000

En la **Tabla 7.10** se presenta el resumen del análisis económico de la planta de producción de biomasa basado en la captura de gases de combustión.

Tabla 7.10. Resumen ejecutivo del análisis económico.

Concepto	Cantidad	
Capital total de inversión	19,679,000	\$
Costos de operación	15,127,000	\$/año
Ingresos principales	2,000	\$/año
Otros ingresos	18,317,303	\$/año
Ingresos totales	18,319,000	\$/año
Tasa de producción anual (Base de Costo)	12.14	Kg Lu/año
Costo unitario de producción	1,245,848.58	\$/kg Lu
Costo neto unitario de producción	1,245,848.58	\$/kg Lu
Ingreso unitario de producción	1,508,681.23	\$/kg Lu
Margen Bruto	17.42	%
Tasa de retorno sobre la inversión (RSI)	18.35	%
Tiempo de recuperación de la inversión (IR)	5.45	años
Tasa interna de retorno (TIR)	8.39	%
Valor presente neto (VPN)	2,002,000	\$

El proceso integrado para la producción simultánea de luteína y lípidos (para la obtención de biodiesel), a partir de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, presenta un diseño técnica y económicamente viable, basado en un sistema de cultivo RWP con una

productividad de 34.4 ton año⁻¹, considerando utilizar corrientes de gas de combustión para aprovechar la captura CO₂ como fuente de carbono. La configuración de este diseño integra proceso en las etapas clave: Cultivo, Separación, Disrupción celular, Extracción, Saponificación y Purificación, simuladas con el software SuperPro Designer v10® alimentado con datos e información generada en los Capítulos anteriores y complementada con referencias actuales del tema.

Los costos de inversión fueron de USD 19.7 millones, con costos de operación de USD 15.1 millones, por otro lado, los ingresos proyectados alcanzan los USD 18.3 millones, derivados de la venta de luteína de USD 1.2 millones kg⁻¹ (140-2800 USD Kg⁻¹, dependiendo de la calidad del producto) y de los lípidos (2.6 USD Kg⁻¹, valor calculado para cepas oleaginosas cultivadas en RWP).

Los indicadores financieros muestran un retorno sobre la inversión de 18.35 % y un margen bruto de 17.42 % con un periodo de recuperación de la inversión de 5.45 años. Estos datos se soportan sobre un VPN > 0, y que alcanza los USD 2 millones con una TIR de 8.39 %. Adicionalmente, el diseño del proceso incluye ingresos por la captura de CO₂ que aporta 9.52 USD ton⁻¹CO₂ lo que aumenta la sostenibilidad del proceso.

Si bien los indicadores financieros son positivos, presentan una rentabilidad baja y un VPN que representa una generación de valor económico mínimo. Por lo que, aun es necesario optimizar la productividad de la biomasa, la eficiencia de extracción de la luteína y los costos de operación.

7.5 Conclusión

El Análisis Tecno-Económico del proceso integrado para la producción de luteína y lípidos a partir de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM demuestra que es viable técnica y económicamente para su aplicación en un modelo de biorrefinería de microalgas. Pero con desafíos de que deben enfrentarse para garantizar una rentabilidad atractiva para los inversionistas y la operación del proceso a largo plazo. Los indicadores financieros presentan un retorno de la inversión aceptable (18.38%), con una TIR moderada (8.36 %), el elevado costo de producción de la luteína (USD 1.2 millones Kg⁻¹) limita su atractivo para los inversionistas.

En conclusión, este modelo de biorrefinería de microalgas representa una alternativa sostenible y económicamente viable, pero su implementación requiere un equilibrio entre

los aspectos técnicos, económicos, mercado, considerando la integración de políticas de economía circular para memorar su competitividad frente a los productos convencionales.

Capítulo 8. Conclusiones y perspectivas

8.1 Conclusiones

- La evaluación de los métodos de acumulación de lípidos como la acidificación controlada del medio de cultivo a pH 5 en combinación con la limitación de la fuente de nitrógeno, demostró ser una estrategia que permite el incremento en la cantidad de lípidos en *Scenedesmus obtusiusculus* AT UAM, alcanzando contenidos de hasta 60% de lípidos en la biomasa y una productividad lipídica de 85 mg L⁻¹ d⁻¹ en sistemas FPP bajo condiciones controladas.
- Los análisis ultraestructurales de la microalga sometida a acidificación mostraron modificaciones adaptativas en la pared celular y un reacomodo en los organelos principalmente en los cloroplastos, que evidencia un cambio metabólico que favorece la síntesis de lípidos.
- Se logró validar el método de acidificación controlada en combinación con limitación de nitrógeno a una escala mayor en sistemas FCB y RWP operados en la intemperie, que mostraron incrementos de 24% a 45 % de lípidos en la biomasa, lo que demuestra que la cepa es robusta para su cultivo en condiciones ambientales.
- La microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, mostró potencial como una cepa productora de luteína, alcanzado una concentración de 4.2 mg L⁻¹ de luteína bajo las mejores condiciones de crecimiento.
- Las estrategias de limitación de la fuente de nitrógeno reducen el contenido de luteína.
- La evaluación de las técnicas para la ruptura celular demostró que la disrupción con perlas de vidrio es el método más eficiente (92% de ruptura celular), superando a la criomolienda (47%) y a la sonicación (20%), por lo que, su uso puede mejorar la extracción de la luteína.
- La evaluación del cultivo a gran escala (950 L), en sistemas RWP de la cepa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM demostró de se puede mantener un buen crecimiento (36 mg L⁻¹ d⁻¹) con tasas de fijación de 0.95 Kg m⁻³ d⁻¹ en condiciones de crecimiento en la intemperie.
- *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM puede utilizar medios alternativos como los fertilizantes foliares (Byfolan Forte®) en sustitución del medio de cultivo convencional (BG-11) y mantener su tasa de crecimiento en cultivos a gran escala en sistemas RWP.
- Los sistemas híbridos para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM demostraron potencial para la captura y remoción de gases de combustión

provenientes de un motogenerador alcanzando una eficiencia de remoción del 100% para este tipo de efluentes.

- El uso de quitosano para la separación de la biomasa por medio de la floculación-coagulación, demostró ser efectivo al utilizar 60 mg L⁻¹, esto puede ayudar a reducir costos operativos en comparación con métodos convencionales.
- El ATE confirma que el proceso integrado de producción de luteína y lípidos es viable técnica y económicamente, con un VPN de USD 2 millones, un retorno de la inversión del 18.35 % y un margen bruto de 17.42 con un periodo de recuperación asegurada de 5.45 años.
- El proceso requiere de una optimización en la eficiencia de acumulación de luteína y en la reducción de los costos operativos.

8.2 Perspectivas

- Evaluar el cultivo en etapas controladas por la adición de nutrientes para la obtención simultánea lípidos y luteína.
- Optimizar el diseño y operación de los fotobiorreactores a gran escala para maximizar la productividad.
- Integrar corrientes residuales (agua residual y gases de combustión) para la reducción de costos y del impacto ambiental.
- Evaluar perlas de zirconio en *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM y comparar si se alcanzan eficiencias cercanas al 97% de ruptura celular, optimizando así el proceso de extracción de luteína.
- Evaluar un análisis de las rutas metabólicas para incrementar la síntesis de los productos de alto valor.
- Evaluar estrategias integrales para la recuperación de los metabolitos presentes en la microalga (carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos).
- Realizar un análisis de ciclo de vida para evaluar el impacto ambiental completo y poder evaluar el modelo como una solución de economía circular.

Capítulo 9. Referencias

- Abdur Razzak, S., Bahar, K., Islam, K.M.O., Haniffa, A.K., Faruque, M.O., Hossain, S.M.Z., Hossain, M.M., 2024. Microalgae cultivation in photobioreactors: sustainable solutions for a greener future. *Green Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2023.10.004>
- Aburai, N., Ohkubo, S., Miyashita, H., Abe, K., 2013. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Res* 2, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.001>
- Arad S., Levy-Ontman O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (3), 358–364.
- Al-sabawi M., Chen J., Ng S. 2012. Fluid catalytic cracking of biomass-derived oils and their blends with petroleum feedstocks: a review. *Energy & Fuels*. 26-5355.
- Al-lwayzy, S.H., Yusaf, T., 2017. Diesel engine performance and exhaust gas emissions using Microalgae *Chlorella protothecoides* biodiesel. *Renew Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.09.035>
- Ansari, F.A., Shrivastav, A., Gupta, S.K., Rawat, I., Bux, F., 2017. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. *Ind Eng Chem Res* 56, 3407–3412. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04814>
- Arad S., Levy-Ontman O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (3), 358–364.
- Azov, Y., 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures inorganic carbon uptake in algal cultures. *Applied environmental microbiology* 43, 1300–1306.
- Balk E., Chung M., Lichtenstein A., Chew P., Kupelnick B., Lawrence A., DeVine D., Lau J. 2004. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors and intermediate markers of cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess.* 93, 1–6.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P., 2007. Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. *J. Phycol* 414, 412–414. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00335.x>
- Béchet, Q., Shilton, A., Fringer, O.B., Munoz, R., Guieysse, B., 2010. Mechanistic modeling of broth temperature in outdoor photobioreactors. *Environ Sci Technol* 44, 2197–2203. <https://doi.org/10.1021/es903214u>
- Becker E. W. 2004 Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science. pp. 312–51.
- Bermejo, E., Ruiz-Domínguez, M.C., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ramos-Merchante, A., Vega, J.M., Vílchez, C., Garbayo, I., 2018. Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light. *J Biosci Bioeng* 125, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.025>
- Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25, 743–756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2013. Bioresource Technology Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol* 143, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>

- Burczyk, J., Zych, M., Ioannidis, N.E., Kotzabasis, K., 2014. Polyamines in Cell Walls of Chlorococcalean Microalgae. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2012-0215>
- Burja A. M., Radianingtyas H., Windust A., Barrow C. J. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72, 1161–1169.
- Busch T.M., Cengel K.A., Finlay J.C., 2009. Pheophorbide a as a photosensitizer in photodynamic therapy: in vivo considerations. *Cancer Biol. Therapy.* 8, 540–542.
- Cabello, J., Morales, M., Revah, S., 2017. Carbon dioxide consumption of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* under transient inlet CO₂ concentration variations. *Science of the Total Environment.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.002>
- Cabello, J., Morales, M., Revah, S., 2014. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. *Chemical Engineering Journal* 252, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.073>
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresour Technol* 181, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>
- Carlson R., Srienc F. 2004. Fundamental Escherichia coli biochemical pathways for biomass and energy production: Creation of overall flux states. *Biotechnol Bioeng* 86, 149–162
- Camacho, F., Macedo, A., 2019. Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review.
- Camarena-Bernard, C., Pozzobon, V., 2024. Evolving perspectives on lutein production from microalgae - A focus on productivity and heterotrophic culture. *Biotechnol Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108375>
- Cerón, M.C., Campos, I., Sánchez, J.F., Ación, F.G., Molina, E., Fernández-Sevilla, J.M., 2008. Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. *J Agric Food Chem* 56, 11761–11766. <https://doi.org/10.1021/jf8025875>
- Chan, M.C., Ho, S.H., Lee, D.J., Chen, C.Y., Huang, C.C., Chang, J.S., 2013. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Biochem Eng J* 78, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.017>
- Chen B., You W., Huang J., Yu Y., Chen W., 2010. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 833–840.
- Chen, C.Y., Jesisca, Hsieh, C., Lee, D.J., Chang, C.H., Chang, J.S., 2016. Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresour Technol* 200, 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.071>
- Chen, C.Y., Lu, I.C., Nagarajan, D., Chang, C.H., Ng, I.S., Lee, D.J., Chang, J.S., 2018. A highly efficient two-stage cultivation strategy for lutein production using heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12. *Bioresour Technol* 253, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.027>
- Cheng, J., Zhu, Y., Zhang, Z., Yang, W., 2019. Modification and improvement of microalgae strains for strengthening CO₂ fixation from coal-fired flue gas in power plants, *Bioresour Technol* 291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121850>

- Cherubini F. 2010. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manage.* 51: 1412-1421.
- Chenl, C.Y., Durbin, E.G., 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton 109, 83–94. <https://doi.org/10.3354/meps109083>
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 25, 294–306.
- Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 26, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Clagnan, E., Dell'Orto, M., Štěrbová, K., Grivalský, T., Artur Câmara Manoel, J., Masojídek, J., D'Imporzano, G., Gabriel Acién-Fernández, F., Adani, F., 2023. Impact of photobioreactor design on microalgae-bacteria communities grown on wastewater: Differences between thin-layer cascade and thin-layer raceway ponds. *Bioresour Technol* 374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128781>
- Cohen Z. 1986. Products from microalgae, *In: Handbook of microalgal mass culture*, Richmond A. CRC Press. pp 421-454.
- Cogne G., Gros J. B., Dussap C. G. 2003 Identification of a metabolic network structure representative of *Arthrospira (Spirulina) platensis* metabolism. *Biotechnol Bioeng* 84, 667–676
- Cordero, B.F., Couso, I., Leon, R., Rodriguez, H., Vargas, M.A., 2012. Isolation and characterization of a lycopene ϵ -cyclase gene of *Chlorella (Chromochloris) zofingiensis*. Regulation of the carotenogenic pathway by nitrogen and light. *Mar Drugs* 10, 2069–2088. <https://doi.org/10.3390/md10092069>
- Davis, R., Aden, A., Pienkos, P.T., 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Appl Energy* 88, 3524–3531. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.04.018>
- de Carvalho Silvello, M.A., Severo Gonçalves, I., Patrícia Held Azambuja, S., Silva Costa, S., Garcia Pereira Silva, P., Oliveira Santos, L., Goldbeck, R., 2022. Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. *Bioresour Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126304>
- Desmorieux H., Decaen N. 2006 Convective drying of *Spirulina* in thin layer, *Journal of Food Engineering* 66, 497–503.
- D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., Bastiaens, L., 2017. Cell disruption technologies. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products* 133–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>
- Dillschneider, R., Steinweg, C., Rosello-Sastre, R., Posten, C., 2013. Biofuels from microalgae: Photoconversion efficiency during lipid accumulation. *Bioresour Technol* 142, 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.088>
- Dineshkumar, R., Dash, S.K., Sen, R., 2015. Process integration for microalgal lutein and biodiesel production with concomitant flue gas CO₂ sequestration: a biorefinery model for healthcare, energy and environment. *RSC Adv* 5, 73381–73394. <https://doi.org/10.1039/c5ra09306f>
- Doucha, J., Lívanský, K., 2008. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1660-6>

- Dunker, S., Wilhelm, C., 2018. Cell Wall Structure of Coccoid Green Algae as an Important Trade-Off Between Biotic Interference Mechanisms and Multidimensional Cell Growth 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00719>
- Estrada-Graf, A., Hernández, S., Morales, M., 2020. Biomitigation of CO₂ from flue gas by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM using a hybrid photobioreactor coupled to a biomass recovery stage by electro-coagulation-flotation. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 28561–28574. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08240-2>
- Eustance, E., Badvipour, S., Wray, J.T., Sommerfeld, M.R., 2016a. Biomass productivity of two *Scenedesmus* strains cultivated semi-continuously in outdoor raceway ponds and flat-panel photobioreactors. *J Appl Phycol* 28, 1471–1483. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0710-6>
- Eustance, E., Wray, J.T., Badvipour, S., Sommerfeld, M.R., 2016b. The effects of cultivation depth, areal density, and nutrient level on lipid accumulation of *Scenedesmus acutus* in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 28, 1459–1469. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0709-z>
- Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Xu, C., 2012. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* 53, 1380–1390. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs082>
- Felföldy, L.J., 1965. Photosynthesis of the unicellular green algal strain, *Scenedesmus obtusiusculus* chod. at various pH values. *Acta Biol Acad Sci Hung* 15, 351–9.
- Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., Fan, L., 2011. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresour Technol* 102, 10577–10584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.109>
- Fernández-Linares, L., Durán-Páramo, E., Guerrero-Barajas, C., 2021. A scale-up evaluation of a semicontinuous culture of *Scenedesmus* sp. in a raceway under greenhouse conditions using a commercial fertilizer as culture medium. *Biofuels* 12, 1291–1299. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1614256>
- Ferruzi, M.G., and Blakeslee, J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1-12.
- Forster J., Famili I., Fu P., Palsson B. O., Nielsen J. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Gen Res* 13, 244–253
- Fu, Y., Wang, Y., Yi, L., Liu, J., Yang, S., Liu, B., Chen, F., Sun, H., 2023. Lutein production from microalgae: A review. *Bioresour Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128875>
- Galasso, C., Corinaldesi, C., Sansone, C., 2017. Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox6040096>
- García Sánchez, J.L., Berenguel, M., Rodríguez, F., Fernández Sevilla, J.M., Brindley Alias, C., Ación Fernández, F.G., 2003. Minimization of Carbon Losses in Pilot-Scale Outdoor Photobioreactors by Model-Based Predictive Control. *Biotechnol Bioeng* 84, 533–543. <https://doi.org/10.1002/bit.10819>
- Gayathri, S.; Rajasree, S.R.R.; Suman, T.Y.; Aranganathan, L.; Thriuganasambandam, R.; Narendrakumar, G., 2020. Induction of β , ϵ -Carotene-3, 3'-Diol (Lutein) Production in Green Algae *Chlorella salina* with Airlift Photobioreactor: Interaction of Different Aeration and Light-Related Strategies. *Biomass Convers. Biorefinery*. 11, 2003-2012.
- Gehl, K.A., Colman, B., 1985. Effect of External pH on the Internal pH of *Chlorella saccharophila*. *Plant Physiol* 77, 917–921.

- Geider R. J., La Roche J. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37, 1-17.
- Gong, J., You, F., 2014. Optimal design and synthesis of algal biorefinery processes for biological carbon sequestration and utilization with zero direct greenhouse gas emissions: MINLP model and global optimization algorithm. *Ind Eng Chem Res* 53, 1563–1579. <https://doi.org/10.1021/ie403459m>
- Gong, M., Bassi, A., 2017. Investigation of *Chlorella vulgaris* UTEX 265 Cultivation under Light and Low Temperature Stressed Conditions for Lutein Production in Flasks and the Coiled Tree Photo-Bioreactor (CTPBR). *Appl Biochem Biotechnol* 183, 652–671. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2537-x>
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21, 493–507. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9392-7>
- Guckert, J.B., Cooksey, K.E., 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *J Phycol.* <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00072.x>
- Gudin C., Chaumont D. 1991. Cell fragility, the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresour Technol.* 38, 141 – 51.
- Heasman M., Diemar J., O'Connor W., Sushames T., Foulkes L. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks – a summary. *Aquacult Res.*31, 637–59.
- Hall D.O., Rao, K.K., 1999. Photosynthetic apparatus, 6th ed. *In: Photosynthesis*, The Press Syndicate of The University of Cambridge, pp. 33–57.
- Han D., Row K.H., 2010. Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules.* 15, 2405–2426.
- Harum R., Danquah M. K. 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* 168, 1079-1084.
- Ho S-H, Chen C.-Y., Lee D.-J., Chang J.-S. 2010. Perspectives on microalgal CO₂ emission mitigation systems. A review. *Biotechnol. Adv. Doi:10.1016/j.biotechadv.2010.11.00.*
- Hu Q. 2004. Environmental effects on cell composition. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A. *Blackwell Science Ltd Oxford.* pp 83-93.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal* 54, 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- International Energy Agency (IEA), Bioenergy Task 42. Biorefineries: Adding Value to the Sustainable Utilization of Biomass. September, 2022.
- Iwamoto, H., Socol, C.R., Molina-Aulestia, D.T., Cardoso, J., de Melo Pereira, G.V., de Souza Vandenbergh, L.P., Manzoki, M.C., Ambati, R.R., Ravishankar, G.A., de Carvalho, J.C., 2024. Lutein from Microalgae: An Industrial Perspective of Its Production, Downstream Processing, and Market. *Fermentation.* <https://doi.org/10.3390/fermentation10020106>
- Jebali, A., Acién, F.G., Rodríguez Barradas, E., Olguín, E.J., Sayadi, S., Molina Grima, E., 2018. Pilot-scale outdoor production of *Scenedesmus* sp. in raceways using flue gases and centrate

- from anaerobic digestion as the sole culture medium. *Bioresour Technol* 262, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.057>
- Jin, J., Dupré, C., Legrand, J., Grizeau, D., 2016. Extracellular hydrocarbon and intracellular lipid accumulation are related to nutrient-sufficient conditions in pH-controlled chemostat cultures of the microalga *Botryococcus braunii* SAG 30.81. *Algal Res* 17, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.007>
- Kannaujiya, V.K., Sundaram, S., Sinha, R.P., 2017. Phycobiliproteins: Recent developments and future applications, Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6460-9>
- Kasani, A.A., Esmaili, A., Golzary, A., 2022. Software tools for microalgae biorefineries: Cultivation, separation, conversion process integration, modeling, and optimization. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102597>
- Kayser A., Weber J., Hecht V., Rinas U. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture: I. Growth-rate dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiol.* 151, 693–706
- Kim Y.-H., Choi Y.-K., Park J., Lee, S., Yang Y.-H., Kim H.J., Park T.-J., Hwan Kim Y., Lee S.H., 2012. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresour Technol.* 109, 312–315.
- Kliphuis M. J., Klok J. A., Martens D. E., Lamers P. P., Janssen M., Wijffels R. H. 2011. Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance. *J. Appl. Phycol.* 24, 253–266
- Koller, A.P., Löwe, H., Schmid, V., Mundt, S., Weuster-Botz, D., 2016. Model-supported phototrophic growth studies with *Scenedesmus obtusiusculus* in a flat-plate photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 9999, 1–13. <https://doi.org/10.1002/bit.26072>
- Kuppens, T., Van Dael, M., Vanreppelen, K., Thewys, T., Yperman, J., Carleer, R., Schreurs, S., Van Passel, S., 2015. Techno-economic assessment of fast pyrolysis for the valorization of short rotation coppice cultivated for phytoextraction. *J Clean Prod* 88, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.07.023>
- Lama, S., Muylaert, K., Karki, T.B., Foubert, I., Henderson, R.K., Vandamme, D., 2016. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Bioresour Technol* 220, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080>
- Lane, A.E., Burris, J.E., 1981. Effects of Environmental pH on the Internal pH of *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Euglena mutabilis*. *Plant Physiol* 68, 439–442.
- Laurens, L.M.L., Markham, J., Templeton, D.W., Christensen, E.D., Wychen, S. Van, Vadelius, E.W., Chen-glasser, M., Dong, T., Pienkos, P.T., 2017. Environmental Science biofuels and bioproducts; a perspective on. *Energy Environ Sci.* <https://doi.org/10.1039/c7ee01306j>
- Lee A. K., Lewis D. M., Ashman P. J. 2009. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J Appl Phycol.* 21, 559–67.
- León-Saiki, G.M., Remmers, I.M., Martens, D.E., Lamers, P.P., Wij, R.H., Veen, D. Van Der, 2017. The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus*. *Algae Research* 25, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.018>

- Lin, J.H., Lee, D.J., Chang, J.S., 2015. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresour Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.099>
- Liu, Xinyue, Liu, Xiaoming, Zhang, Z., 2024. Application of red mud in carbon capture, utilization and storage (CCUS) technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114683>
- Ma, R., Zhao, X., Ho, S.H., Shi, X., Liu, L., Xie, Y., Chen, J., Lu, Y., 2020. Co-production of lutein and fatty acid in microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 in response to different temperatures with gene expression profiles. *Algal Res* 47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101821>
- Mackinder, L.C.M., Chen, C., Leib, R.D., Ramundo, S., Adams, C.M., Jonikas, M.C., Mackinder, L.C.M., Chen, C., Leib, R.D., Patena, W., Blum, S.R., Rodman, M., 2017. A Spatial Interactome Reveals the Protein Organization of the Algal CO₂ -Concentrating Mechanism. *Cell* 171, 133-147.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.044>
- Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Nayaka, S., Ramteke, P.W., 2016. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresour Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042>
- Markou G., Argelidaki I., Georgakakis D. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Mascarelli A., 2009. Gold rush for algae. *Nature* 461, 460–461.
- Maximize Market Research, 2024. Lutein Market – Global Industry Analysis and Forecast (2022–2029). Ultimo acceso en 28 abril, 2025. <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/lutein-market/661/>.
- McClure, D.D., Nightingale, J.K., Luiz, A., Black, S., Zhu, J., Kavanagh, J.M., 2019. Pilot-scale production of lutein using *Chlorella vulgaris*. *Algal Res* 44. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101707>
- Meszies, G., Erdei, L., 1969. The effect of pH on the ATPase activity of the unicellular Alga *Scenedesmus obtusiusculus* CHOD. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* 4, 357–63.
- Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S., Yang, J.W., 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol* 155, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Mohamed Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against Microcystis induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology*. 17, 504–516.
- Molina E., Medina A., Giménez A., Sánchez Pérez J., Camacho F., García Sánchez J.1994. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71, 955–959.
- Molina E., Belarbi E-H., Fernández F. G. Robles Medina, Yusuf Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20: 491–515
- Molino, A., Mehariya, S., Iovine, A., Larocca, V., Di Sanzo, G., Martino, M., Casella, P., Chianese, S., Musmarra, D., 2018. Extraction of Astaxanthin and Lutein from Microalga *Haematococcus*

- pluvialis* in the Red Phase Using CO₂ Supercritical Fluid Extraction Technology with Ethanol as Co-Solvent. *Mar Drugs* 16. <https://doi.org/10.3390/md16110432>
- Morales, M., Revah, S., Aut, U., 2018. The impact of environmental factors on carbon dioxide fixation by microalgae. *FEMS Microbiol Lett* 365, fnx26, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx262>
- Muhammad, G., Butler, T.O., Chen, B., Lv, Y., Xiong, W., Zhao, X., Solovchenko, A.E., Zhao, A., Mofijur, M., Xu, J., Alam, M.A., 2024a. Sustainable production of lutein—an underexplored commercially relevant pigment from microalgae. *Biomass Convers Biorefin.* <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03349-5>
- Muhammad, G., Butler, T.O., Chen, B., Lv, Y., Xiong, W., Zhao, X., Solovchenko, A.E., Zhao, A., Mofijur, M., Xu, J., Alam, M.A., 2024b. Sustainable production of lutein—an underexplored commercially relevant pigment from microalgae. *Biomass Convers Biorefin.* <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03349-5>
- Nagappan, S., Tsai, P., Devendran, S., Alagarsamy, V., Ponnusamy, V.K., 2020. Enhancement of biofuel production by microalgae using cement flue gas as substrate 17571–17586.
- Oh HM, Lee SJ, Park MH, Kim HS, Kim HC, Yoon JH. 2001 Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnol Lett.* 23, 1229–34.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., Mishra, S., 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol* 156, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Patel, A., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L., 2022. Microalgal lutein biosynthesis: Recent trends and challenges to enhance the lutein content in microalgal cell factories. *Front Mar Sci.* <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1015419>
- Patel, A.K., Tambat, V.S., Chen, C.W., Chauhan, A.S., Kumar, P., Vadrale, A.P., Huang, C.Y., Dong, C. Di, Singhania, R.R., 2022. Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review. *Bioresour Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128030>
- Pawlowski, A., Guzmán, J.L., Berenguel, M., Acién, F.G., 2019. Control System for pH in Raceway Photobioreactors Based on Wiener Models. *IFAC-PapersOnLine.* <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.06.181>
- Pérez-López, P., Montazeri, M., Feijoo, G., Moreira, M.T., Eckelman, M.J., 2018. Integrating uncertainties to the combined environmental and economic assessment of algal biorefineries: A Monte Carlo approach. *Science of the Total Environment* 626, 762–775. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.339>
- Postma, P.R., Miron, T.L., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresour Technol* 184, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Prakash J.; Pushparaj B., Carlozzi P., Torzillo G., Montaini E., Materassi R. 1997. Microalgae drying by a simple solar device, *International Journal of Solar. Energy* 18, 303–311.
- Raven J. A., Beardall J. 2004. Carbohydrate metabolism and respiration in algae in: Larkum A. W. D., Douglas S. E., Raven J. A. *Photosynthesis in algae*, vol 4. *Advances in photosynthesis and respiration.* Springer. pp. 205-224.
- Reed J. L., Palsson B. O. 2003 Thirteen years of building constraint-based *in silico* models of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 2692-2699.

- Romieu I., Tellez-Rojo M. M., Lazo M., Manzano-Patino A., Cortez-Lugo M., Julien P., Belanger M. C., Hernandez-Avila M., Holguin F. 2005. Omega-3 fatty acid prevents heart rate variability reductions associated with particulate matter. *Am J Respir Crit Care Med.* 172, 1534–1540.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P.A., Ogden, K.L., 2017. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Rajput, A., Singh, D.P., Khattar, J.S., Swatch, G.K., Singh, Y., 2022. Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions. *J Basic Microbiol* 62, 1156–1166. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100285>
- Ras, M., Steyer, J.P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Richmond, A., Hu, Q., 2013. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition, Handbook of Microalgal Culture: *Applied Phycology and Biotechnology*: Second Edition. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- Richmond, A., Lichtenberg, E., Stahl, B., Vonshak, A., 1990. Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *J Appl Phycol* 2, 195–206. <https://doi.org/10.1007/BF02179776>
- Sánchez-García, L., Cabello, J., Jiménez-García, L.F., Revah, S., Morales-Ibarria, M., 2020. Enhancing the lipid content of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM by controlled acidification under indoor and outdoor conditions. *Algal Res* 51. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102024>
- Sandnes, J.M., Ringstad, T., Wenner, D., Heyerdahl, P.H., Källqvist, T., Gislerød, H.R., 2006. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. *J Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.034>
- Santos, A.M., Lamers, P.P., Janssen, M., Wijffels, R.H., 2013. Biomass and lipid productivity of *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Algal Res* 2, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.007>
- Santos, A.M., Wijffels, R.H., Lamers, P.P., 2014. pH-upshock yields more lipids in nitrogen-starved *Neochloris oleoabundans*. *Bioresour Technol* 152, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.079>
- Sarma, S., Sharma, S., Rudakiya, D., Upadhyay, J., Rathod, V., Patel, A., Narra, M., 2021. Valorization of microalgae biomass into bioproducts promoting circular bioeconomy: a holistic approach of bioremediation and biorefinery. *Biotech.* <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02911-8>
- Satoh, A., Kurano, N., Miyachi, S., 2001. Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO₂. *Photosynth Res* 68, 215–224. <https://doi.org/10.1023/A:1012980223847>
- Seyed, N., Shang, H., Ashley, J., 2018. Biosequestration of industrial off-gas CO₂ for enhanced lipid productivity in open microalgae cultivation systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.086>

- Sharma, R., Mishra, A., Pant, D., Malaviya, P., 2022. Recent advances in microalgae-based remediation of industrial and non-industrial wastewaters with simultaneous recovery of value-added products. *Bioresour Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126129>
- Shastri A. A., Morgan J. A. 2005. Flux Balance Analysis of Photoautotrophic Metabolism. *Biotechnol. Prog.* 21, 1617-1626.
- Shi, X.-M., Liu, H.-J., Zhang, X.-W., Chen, F., 1999. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures, *Process Biochemistry*.
- Siaut, M., Cui n , S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphyllid s, C., Li-beisson, Y., Peltier, G., 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves.
- Silva, S.C., Ferreira, I.C.F.R., Dias, M.M., Filomena Barreiro, M., 2020. Microalgae-derived pigments: A 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules25153406>
- Singh, J., Dhar, D.W., 2019. Overview of Carbon Capture Technology: Microalgal Biorefinery Concept and State-of-the-Art 6, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00029>
- Singh Khichi, S., Anis, A., Ghosh, S., 2018. Mathematical modeling of light energy flux balance in flat panel photobioreactor for *Botryococcus braunii* growth, CO₂ biofixation and lipid production under varying light regimes. *Biochem Eng J* 134, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.001>
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., Nikolov, Z.L., 2018. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Res.* <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Spinola, M.V., D az-Santos, E. (2020). Microalgae Nutraceuticals: The Role of Lutein in Human Health. In: Alam, M., Xu, J.L., Wang, Z. (eds) *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_7
- Stephens E., Ross, I.L., King, Z., Mussnug J.H., Kruse O., Posten C., Borowitzka M.A., Hankamer B., 2010. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nat. Biotechnol.* 28, 126–128.
- Sukenik A. 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresour Technol.* 35, 263–269.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour Technol* 102, 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>
- Terry, N., Abad a, J., 1986. Function of iron in chloroplasts. *Plant Nutrition* 9, 609–646. <https://doi.org/10.1080/01904168609363470>
- Toledo-Cervantes, A., Gardu o Sol rzano, G., Campos, J.E., Mart nez-Garc a, M., Morales, M., 2018. Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnology Reports* 17, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.009>
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour Technol* 130, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081>

- Travieso L., Benítez, F., Sánchez E., Borja R., Colmenarejo M.F., 2006. Production of biomass (algae–bacteria) by using a mixture of settled swine and sewage as substrate. *J. Environ. Sci. Health A* 41, 415–429.
- Vadrale, A.P., Dong, C. Di, Haldar, D., Wu, C.H., Chen, C.W., Singhanian, R.R., Patel, A.K., 2023. Bioprocess development to enhance biomass and lutein production from *Chlorella sorokiniana* Kh12. *Bioresour Technol* 370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128583>
- Vandamme D., Foubert I., Meesschaert B., Muylaert K. 2010 Flocculation of microalgae using cationic starch. *J Appl Phycol.* 22, 525–30.
- Vanthoor-Koopmans M., Wijffels R.H., Barbosa M. J., Eppink M. H. 2012. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol.*
- Waltz E., 2009. Biotech, Green gold? *Nat. biotechnol.* 27, 15-18.
- Wang, B., Lan, C.Q., Horsman, M., 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
- Wang, X., Liang, J., Luo, C., Chen, C., Gao, Y., 2014. Bioresource Technology Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO₂ levels. *Bioresour Technol* 161, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.012>
- Wang, X., Zhang, Y., Xia, C., Alqahtani, A., Sharma, A., Pugazhendhi, A., 2023. A review on optimistic biorefinery products: Biofuel and bioproducts from algae biomass. *Fuel* 338. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127378>
- Wang, Y., Tibbetts, S.M., McGinn, P.J., 2021. Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. *Foods.* <https://doi.org/10.3390/foods10123002>
- Williams, P.J.L.B., Laurens, L.M.L., 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ Sci* 3, 554–590. <https://doi.org/10.1039/b924978h>
- Wijffels R. H., Barbosa M. J., Eppink M. H. 2010. Microalgae for the production of bulk chemical and biofuels. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 4, 287-295.
- Williams P. J. B., Laurence L. M. L., 2010. Microalgae as a biodiesel and biomass feedstock: review and analysis of biochemistry, energetics and economics. *Energy and env Sci.* 3, 554-590.
- Wolf, J., Stephens, E., Steinbusch, S., Yarnold, J., Ross, I.L., Steinweg, C., Doebbe, A., Krolovitsch, C., Müller, S., Jakob, G., Kruse, O., Posten, C., Hankamer, B., 2016. Multifactorial comparison of photobioreactor geometries in parallel microalgae cultivations. *ALGAL* 15, 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.018>
- Xie, Y., Ho, S.H., Chen, C.N.N., Chen, C.Y., Ng, I.S., Jing, K.J., Chang, J.S., Lu, Y., 2013. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresour Technol* 144, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.064>
- Xie, Y., Zhao, X., Chen, J., Yang, X., Ho, S.H., Wang, B., Chang, J.S., Shen, Y., 2017. Enhancing cell growth and lutein productivity of *Desmodesmus* sp. F51 by optimal utilization of inorganic carbon sources and ammonium salt. *Bioresour Technol* 244, 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.022>

- Xu, P., Li, J., Qian, J., Wang, B., Liu, J., Xu, R., Chen, P., Zhou, W., 2023. Recent advances in CO₂ fixation by microalgae and its potential contribution to carbon neutrality. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137987>
- Yadav, G., Dash, S.K., Sen, R., 2019. A biorefinery for valorization of industrial wastewater and flue gas by microalgae for waste mitigation, carbon-dioxide sequestration and algal biomass production. *Science of the Total Environment* 688, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.024>
- Yadav, G., Dubey, B.K., Sen, R., 2020. A comparative life cycle assessment of microalgae production by CO₂ sequestration from flue gas in outdoor raceway ponds under batch and semi-continuous regime. *J Clean Prod* 258, 120703. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120703>
- Yadav, K., Vasistha, S., Nawarkar, P., Kumar, S., Rai, M.P., 2022. Algal biorefinery culminating multiple value-added products: recent advances, emerging trends, opportunities, and challenges. *Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03288-y>
- Yan R., Zhang Z., Zeng Q., Zhu D., Chu J. 2011. Characterization of Energy Conversion of *Synechococcus* sp. PCC7942 under Photoautotrophic Conditions Based on Metabolic Flux and Chlorophyll Fluorescence Analysis. *Biotechnol. and Bioprocess Engineering* 16, 520-530.
- Yang C., Hua Q., Shimizu K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.* 6, 87–102
- Yap, B.H.J., Crawford, S.A., Dagastine, R.R., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2016. Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43, 1671–1680. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1848-1>
- Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. *Bioresour Technol* 135, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>
- Yongmanitchai W., Ward O. P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol.* 57, 419–425.
- Zhang, K., Kurano, N., Miyachi, S., 1999. Outdoor culture of a cyanobacterium with a vertical flat plate photobioreactor: effects on productivity of the reactor orientation, distance setting between the plates, and culture temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 781–786. <https://doi.org/10.1007/s002530051591>
- Zheng, H., Wang, Y., Li, S., Nagarajan, D., Varjani, S., Lee, D.J., Chang, J.S., 2022. Recent advances in lutein production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 153. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111795>
- Zhu L., Zhang X., Ji L., Song X., Kuang C. 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochem.* 42, 210–214.
- Zhu, S., Huang, W., Xu, Jin, Wang, Z., Xu, Jingliang, Yuan, Z., 2014. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology* 152, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>

Anexos

Anexo 1. Lista de Productos

- Hernández–Martínez, I., González–Reséndiz, **L., Sánchez–García**, L., Viguera–Ramírez, G., Arroyo–Maya, I. J., & Morales–Ibarría, M. (2022). C-phycoyanin production with high antioxidant activity of a new thermotolerant freshwater *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 strain. *Bioresource Technology*, 369, 128431. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128431
- González-Reséndiz, **L., Sánchez-García**, L., Hernández-Martínez, I., Viguera-Ramírez, G., Jiménez-García, L. F., Lara-Martínez, R., & Morales-Ibarría, M. (2021). Photoautotrophic poly (3-hydroxybutyrate) production by a wild-type *Synechococcus elongatus* isolated from an extreme environment. *Bioresource Technology*, 337, 125508.
- **Sánchez-García L.**, Cabello, J., Jiménez-García, L. F., Revah, S., Morales-Ibarría M., (2020), Enhancing the lipid content of *Scenedesmus* AT-UAM by controlled acidification under indoor and outdoor conditions. *Algal research*, DOI: [10.1016/j.algal.2020.102024](https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102024)
- González-Reséndiz, L., Johansen, J. R., León-Tejera, H., **Sánchez, L.**, Segal-Kischinevsky, C., Escobar-Sánchez, V., & Morales, M. (2019). A bridge too far in naming species: a total evidence approach does not support recognition of four species in *Desertifilum* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 55(4), 898-911 DOI:10.1111/jpy.12867
- Morales, M., **Sánchez, L.**, Revah, S. (2018). The impact of environmental factors on CO₂ fixation by microalgae. *FEMS Microbiology letters*. DOI: 10.1093/femsle/fnx262
- Pierre-Louis Gorry, **León Sánchez** and Marcia Morales (2018), Microalgae Biorefineries for Energy and Coproduct Production. En *Energy from Microalgae*, Editor Eduardo Jacob-Lopez, Ed. Springer International Publishing. Capítulo 5.
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., **Sánchez, L.**, Revah, S., & Morales, M. (2015). Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technol.*
- **León Sánchez**, Marcia Morales (2015), Microalgae as source of high added-value compounds: carotenoids en Microalgae and other phototrophic bacteria: culture, processing, recovery and new products. Torres Bustillos L. Editor. Ed. NOVA Science. Capítulo 12.

Anexo 2. Participación en congresos

- Aline Guadalupe Chávez Domínguez, Luis Felipe Chávez-Flores, **León Sánchez**, Marcia Morales Ibarria, Dolores Reyes-Duarte. Presentación del poster “Diversificación del uso de lípidos de microalgas: Síntesis enzimática de surfactantes biológicos” XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Junio 2019, León, Guanajuato, México.
- Ingrid Hernández-Martínez, Laura González-Reséndiz, **León Sánchez García**, Izlia Arrollo-Maya, Marcia Morales-Ibarría. Presentación del poster "Cultivation of cyanobacterium *Desertifilum* sp. for production of biomass and C-phycoyanin" XXXII Congreso Nacional de Bioquímica. Noviembre 2018, Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero, México.
- **León Sánchez**, Marcia Morales. Presentación de poster “Operación en semicontinuo de un fotobiorreactor de placas planas para el crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus*” XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio 2017, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- **León Sánchez**, Juan Cabello, Sergio Revah, Marcia Morales. Presentation de poster “Potential of the microalgae *Scenedesmus obtusiusculus* for lutein production”. 6a Conferencia Internacional de Biomasa Algal, Biocombustibles y Bioproductos, Junio del 2016, San Diego, California, E.U.A.
- **León Sánchez**, Juan Cabello, Perre Gorry, Sergio Revah, Marcia Morales. Presentación de poster “Influence of acid pH on *Scenedesmus obtusiusculus* outdoor culture under nitrogen deplete conditions” 10th Conferencia de la Sociedad Internacional para la Biotecnología Ambiental, Junio 2016, Barcelona, España.
- Alma Toledo, Juan Cabello, **León Sánchez**, Marcia Morales. Presentación de poster “Biomass production and lipid storage of *Scenedesmus obtusiusculus* under optimal pH, temperature and light intensity”. 4a Conferencia Internacional de Biomasa Algal, Biocombustibles y Bioproductos, Junio del 2014, Santa Fe, Nuevo México E.U.A.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA


No. 00295

Matrícula: 2141801392

Biorrefinería a partir de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM: Producción de lípidos y pigmentos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 20 del mes de mayo del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ
- DRA. MARIA LAURA GONZALEZ RESENDIZ
- DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES
- DR. JUAN JOSE CABELLO ROBLES



LEON SANCHEZ GARCIA
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: LEON SANCHEZ GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE




DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ

VOCAL



DRA. MARIA LAURA GONZALEZ RESENDIZ

VOCAL



DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES

SECRETARIO



DR. JUAN JOSE CABELLO ROBLES