



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE NITRÓGENO,
FÓSFORO Y CLORURO DE SODIO EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA, CONTENIDO TOTAL DE
LÍPIDOS Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN
*Scenedesmus acutus***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

IBT. ALEJANDRO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

CO-DIRECTORES DE TESIS:

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

ASESOR:

DRA. ELENA DIBILDOX ALVARADO



SAN LUIS POTOSÍ

JUNIO 2018

PROYECTO REALIZADO EN:
EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE CÉLULAS
VEGETALES DE LA UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS Y
LABORATORIO DE BIOSEPARACIONES Y BIOPOLÍMEROS ALIMENTARIOS
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.

APOYO DE LA BECA OTORGADA POR:
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)
BECA-TESIS (CONVENIO NO. 331808)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi directora de tesis la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por su inspiradora manera de trabajar, su paciencia, y admirable conocimiento, así como su guía durante todo el proyecto.

Agradezco a mi codirector el Dr. Omar González Ortega y a mi Asesora la Dra. Elena Dibildox Alvarado, por su paciencia, comentarios y orientación durante el proyecto.

Un gran agradecimiento a la Dra. Erika Ochoa por su apoyo y capacitación en técnicas para beneficio de este proyecto, y a mi compañera Mariana Orozco por su apoyo.

Le agradezco a mis padres Ma. Juana e Isidro por sus consejos, amor y motivación para finalizar este trayecto, a mi Hermano Juan Erick y mi cuñada Leticia, por sus frases motivacionales.

Y, finalmente a mi compañera, amiga, consejera, socia, y novia Ana, por todo su apoyo incondicional.

Abreviaturas y nomenclaturas

ANOVA	Análisis de varianza
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (Ésteres metílicos de los ácidos grasos)
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid (Ácidos Grasos Monoinsaturados)
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid (Ácidos Grasos Poli-insaturados)
SFA	Saturated Fatty Acid (Ácidos Grasos Saturados)
TAG	Triacilglicerol
TG	Triglicéridos

Índice de temas

Abreviaturas	v
Índice de temas	vi
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	x
Resumen/Abstract	xi
Introducción	1
Capítulo 1	4
ANTECEDENTES	4
1.1 Biodiesel	
1.2 Generaciones de combustibles	4
1.2.1 Primera generación (aceites comestibles)	5
1.2.2 Segunda generación (aceites no comestibles)	5
1.2.3 Tercera generación (otras fuentes)	6
1.3 Producción de lípidos en microalgas	6
1.4 Crecimiento de microalgas	8
1.4.1 Crecimiento autotrófico	8
1.4.1.1 Crecimiento en estanques abiertos	8
1.4.1.2 Fotobiorreactor cerrado	9
1.4.2 Crecimiento heterotrófico	10
1.4.3 Crecimiento mixotrófico	10
1.4.4 Otras técnicas de crecimiento	11
1.5 Características de <i>Scenedesmus</i>	12
1.6 Efecto de las condiciones de crecimiento en la producción de lípidos en microalgas	12
1.7 Efecto de los nutrientes en el cultivo de microalgas	14
1.7.1 Efecto de la fuente de carbono (C) en el crecimiento de microalgas	14
1.7.2 Efecto del nitrógeno (N) en el desarrollo de microalgas	14
1.7.3 Efecto del fósforo (P) en el crecimiento de microalgas	15
1.7.4 Efecto de la salinidad	15
Capítulo 2	17
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
2.1 Justificación	17
2.1.1	17
2.2 Objetivos	18
2.2.1 Objetivo general	18
2.2.2 Objetivos específicos	18
Capítulo 3	19
METODOLOGÍA	19
3.1 Diseño de experimentos	19
3.2 Construcción del sistema de aireación	19
3.3 Condiciones del cultivo para <i>Scenedesmus acutus</i>	20

3.4 Cinética de crecimiento	21
3.5 Pruebas de lisis celular	22
3.6 Cuantificación de proteínas de <i>S. acutus</i>	22
3.7 Extracción y cuantificación de clorofila de <i>Scenedesmus acutus</i>	22
3.8 Extracción de lípidos totales	23
3.8.1 Perfil de ácidos grasos	24
Capítulo 4	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Diseño experimental	25
4.2 Sistema de aireación para suministro de CO ₂	26
4.3 Cinética de crecimiento para <i>Scenedesmus acutus</i>	27
4.4 Cuantificación de proteínas solubles en <i>Scenedesmus acutus</i>	32
4.5 Cuantificación de clorofila A en <i>Scenedesmus acutus</i>	36
4.6 Cuantificación de biomasa total en <i>Scenedesmus acutus</i>	39
4.7 Cuantificación de lípidos totales y perfil de ácidos grasos de <i>S. acutus</i>	42
4.7.1 Perfil de ácidos grasos de <i>Scenedesmus acutus</i>	46
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

Índice de Figuras

Figura 1	Representación del sistema de alimentación de aire para los experimentos de la Tabla 1	20
Figura 2	Sistema de aireación final utilizado en la experimentación	27
Figura 3	Cinética de crecimiento de <i>Scenedesmus acutus</i>	28
Figura 4	Efecto de la concentración de N (0%, 50% y 100%) en el crecimiento <i>S. acutus</i>	30
Figura 5	Efecto de la concentración del P (0%, 50% y 100%) en el crecimiento de <i>S. acutus</i>	31
Figura 6	Efecto de la concentración de NaCl (0%, 50% y 100%) en el crecimiento de <i>S. acutus</i>	32
Figura 7	Determinación de proteínas solubles en <i>S. acutus</i>	33
Figura 8	Efecto de la concentración de N en la producción de proteínas de <i>S. acutus</i> ($p < 0.05$)	34
Figura 9	Efecto de la concentración de P en la generación de proteínas solubles de <i>S. acutus</i>	35
Figura 10	Efecto de la concentración de NaCl en la síntesis de proteínas de <i>Scenedesmus acutus</i>	36
Figura 11	Determinación de clorofila A en <i>S. acutus</i>	37
Figura 12	Análisis de clorofila A en distintas concentraciones de N, P y NaCl (experimentos IV, V, VI, VII, VIII, IX) en <i>S. acutus</i>	38
Figura 13	Cuantificación de biomasa total (en peso seco) en <i>S. acutus</i> en distintas concentraciones de N, P y NaCl (experimentos IV, V, VI, VII, VIII, IX)	39
Figura 14	Efecto de la concentración de N (50%, 100%) para la generación de biomasa en <i>S. acutus</i>	40

Figura 15	Efecto de la concentración de P (0, 50, 100 %) para la generación de biomasa en <i>S. acutus</i>	41
Figura 16	Efecto de la concentración de NaCl (0, 50, 100 %) para la generación de biomasa en <i>S. acutus</i>	42
Figura 17	Concentración de lípidos totales en las diferentes condiciones experimentales	43
Figura 18	Efecto de la concentración de N (50%, 100%) para la generación de lípidos en <i>S. acutus</i>	44
Figura 19	Efecto de la concentración de P en la biosíntesis lipídica de <i>S. acutus</i>	45
Figura 20	Efecto de la concentración de NaCl (0, 50, 100 %) en la biosíntesis de lípidos de <i>Scenedesmus acutus</i>	46
Figura 21	Lípidos derivatizados de los experimentos IV, V, VI, VII, VIII y IX	47
Figura 22	Porcentaje de ácidos grasos (SFA, MUFA, PUFA y otros) presentes en <i>S. acutus</i> bajo las diferentes condiciones experimentales	47

Índice de tablas

Tabla 1	Diseño de experimentos factorial fraccionado para evaluar el efecto del N, P y NaCl para la generación ácidos grasos y biomasa en <i>Scenedesmus acutus</i>	19
Tabla 2	Medio de cultivo Basal Bold	20
Tabla 3	Diseño factorial fraccionado para las diferentes concentraciones de nutrientes	25
Tabla 4	Concentración de N, P y NaCl (mg L^{-1}) establecidas a partir del diseño experimental con base en la concentración del medio Basal Bold	26
Tabla 5	Porcentaje de ácidos grasos presentes en <i>Scenedesmus acutus</i> bajo concentraciones de N, P y NaCl (0, 50, 100 %)	48

RESUMEN

Debido al explotamiento excesivo de las reservas petrolíferas y a la gran demanda de diésel fósil, es necesario el uso de una alternativa sustentable que permita obtener un combustible homólogo al diésel, como el biodiesel, con las respectivas ventajas medioambientales y de sustentabilidad que se requieren hoy en día. El uso de microalgas representa una alternativa viable para la síntesis de lípidos que pueden utilizarse para generar biodiesel. El objetivo de este estudio fue evaluar la variación de la concentración inicial de nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y salinidad en el medio de cultivo Basal Bold para favorecer el crecimiento de biomasa y la generación de ácidos grasos favorables para la conversión a biodiesel en la microalga *S. acutus*.

Los resultados obtenidos al realizar un diseño experimental variando las concentraciones iniciales de N, P y NaCl (0%, 50% y 100%) indican que al estar en limitación de nitrógeno, *Scenedesmus acutus* limita su crecimiento, lo cual se debe a que este nutriente influye directamente en la formación de aminoácidos; de igual modo, la deficiencia de P contribuye a obtener menores tasas de crecimiento. Por otra parte, el crecimiento de *S. acutus* también se ve afectado por la concentración de NaCl.

La mayor acumulación de lípidos en *S. acutus* se observó en el experimento que contiene 50% de N, 0%NaCl y 100% de P y la menor cantidad de lípidos se muestra en los experimentos con concentraciones de 100% de nitrógeno. La cantidad de ácidos grasos saturados (SFA) se presentó en porcentajes mayores al 20% en todos los experimentos; mientras que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se presentan hasta en un 40% en los experimentos V (N 50%, P50%, NaCl 50%) y VI (N 50%, P 100%, NaCl 0%), sin embargo, en las demás condiciones (experimentos IV, VII, VIII y IX) la cantidad de ácidos grasos no llegó a ser mayor del 30%.

ABSTRACT

Due to the excessive exploitation of oil reserves and the high demand for fossil diesel, is necessary to use a sustainable alternative that allows obtaining an homologous fuel to diesel, such as biodiesel, with the respective environmental and sustainability advantages that are required today. The use of microalgae represents a viable alternative for the synthesis of lipids that can be used to obtain biodiesel. The objective of this study was to evaluate the variation of the initial concentration of nutrients such as nitrogen (N), phosphorus (P) and salinity in the Basal Bold culture medium in order to stimulate the growth and the generation of favorable fatty acids for the conversion to biodiesel in the microalga *Scenedesmus acutus*.

The results obtained when performing an experimental design varying the initial concentrations of N, P and NaCl (0%, 50% and 100%) indicate that during nitrogen limitation, *S. acutus* limits their growth, which is due to the fact that this nutrient directly influences the amino acids synthesis ; likewise, P deficiency contributes to lower growth rates. On the other hand, the growth of *S. acutus* is also affected by the NaCl concentration.

The highest accumulation of lipids in *S. acutus* was observed in the experiment containing 50% N, 0% NaCl and 100% P and the lowest amount of lipids is shown in the experiments with 100% nitrogen concentrations. The amount of saturated fatty acids (SFA) was presented in percentages higher than 20% in all experiments; whereas monounsaturated fatty acids (MUFA) are present up to 40% in experiments V (N 50%, P50%, NaCl 50%) and VI (N 50%, P 100%, NaCl 0%); however, under the other conditions (experiments IV, VII, VIII and IX) the amount of fatty acids did not reach more than 30%.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los combustibles provienen hoy en día de fuentes fósiles. El petróleo es la materia prima principal para la síntesis del diésel que demandan los diversos medios de transporte. Sin embargo la consecuente demanda de combustibles ha causado una sobreexplotación de este recurso, originando una disminución de las reservas disponibles. Por otra parte el uso de combustibles fósiles ha favorecido el incremento de la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera, originando problemas para el ecosistema. Por las razones anteriores es de gran importancia buscar alternativas que reemplacen parcial o totalmente el uso de combustibles fósiles, utilizando materias primas renovables; con las consecuentes ventajas de sustentabilidad en términos económicos y ambientales.

Se han propuesto distintos tipos de materias primas como fuente renovable para la síntesis de combustibles, dentro de los combustibles más estudiados se encuentra el biodiesel (sustituto del diésel). En la primera generación de biodiesel se ha utilizado aceite vegetal comestible (girasol, canola, soja) como fuente principal, lo cual ha originado un conflicto alimenticio por el uso de estos aceites para generación de combustible en lugar de estar destinados al consumo humano. Para la segunda generación de combustibles se han utilizado aceites no comestibles (higuerilla, jatropha y algodón) pero el desplazamiento de los cultivos agrícolas comestibles por no comestibles es un gran problema. En la búsqueda de una mejor alternativa se ha optado por utilizar microalgas, las cuales ofrecen ventajas atractivas comparadas con los combustibles de primera y segunda generación (Sakthivel y Ramesh, 2018).

El interés por el cultivo de microalgas para la generación de biodiesel se debe al alto contenido lipídico de algunas especies y al hecho de que la síntesis de lípidos puede ser modificada por cambios en las condiciones del cultivo (Villanueva, 2013), además de que son ampliamente consideradas para ser la opción más sustentable para la generación de biodiesel; el cual tiene el potencial

para reemplazar el diésel fósil y ayudar a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

Hoy en día se han investigado distintas especies de microalgas que han demostrado tener una elevada capacidad de síntesis lipídica, llegando a alcanzar rendimientos de hasta un 62% de lípidos en peso seco utilizando diferentes medios de cultivo (Prakash, 2014); además las microalgas tienen una tasa de crecimiento 10-200 veces más rápida que la de los cultivos terrestres (Peng y col., 2012). Los géneros de microalgas tales como *Chlorella*, *Nanochloropsis* y *Scenedesmus* han sido reportados como los géneros de mayor productividad lipídica, presentando *Scenedesmus* hasta un 51% de lípidos en condiciones normales (TM Mata y col., 2010).

Sin embargo la escasa información para algunas especies de microalgas hace necesario un mayor estudio de éstas, una de ellas es *Scenedesmus acutus*, por lo que el objetivo de este proyecto es identificar el efecto de la variación de las concentraciones iniciales de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Cloruro de Sodio (NaCl) en la síntesis lipídica y la producción de biomasa.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

Con la expansión simultánea de la población y la industrialización; la disminución de las reservas de combustibles fósiles conduce a un aumento en el precio del petróleo (Banković-Ilić y *col.*, 2012). Los diversos sectores como el transporte, la industria y la agricultura consumen la mayor parte de la energía producida por las diferentes fuentes como el carbón, el petróleo, la madera, el viento, la energía solar y la nuclear (Chang y *col.*, 2003; Mirza y *col.*, 2007; Correa y *col.*, 2008). Al analizar el consumo de combustible sectorial, el sector del transporte aportó el 64.5% del consumo mundial total de petróleo en el año 2014. Esto representa casi un 42% de aumento en comparación con el año de 1973 (IEA, 2016). Dado que el motor principal utilizado para las flotas de transporte son los motores diésel, los biocombustibles ganan una atención próspera entre los investigadores como un posible sustituto de los combustibles diésel (Dermibas, 2009; Azad y *col.*, 2014). En el aspecto ambiental el motor diésel emite contaminantes nocivos como partículas, hidrocarburos no quemados, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono y humo. Entre los diversos contaminantes los más notables son los óxidos de nitrógeno y el humo (Sheehan y *col.*, 1998; Raja y *col.*, 2003; Senthikumar y *col.*, 2005; Dermibas, 2005; Ramadhas y *col.*, 2006). Además, la acumulación de dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero en la atmósfera son responsables del cambio climático y otras consecuencias globales para la vida en el ámbito de la tierra (Nabi y *col.*, 2009). Se ha pronosticado que la concentración atmosférica de CO₂ aumentará en un 80% en el año 2030 al compararse con el año 2007 (Metz y *col.*, 2007). El deterioro de las reservas de combustibles fósiles y las crecientes preocupaciones ambientales han llevado a los investigadores a desarrollar fuentes alternativas de los combustibles basados en petróleo tradicionales (Dermibas, 2009; No S-Y, 2011; Kumar y *col.*, 2013). Es por esto que el uso y síntesis de biodiesel se ha convertido en una de las opciones a considerar dado su potencial como posible sustituto del diésel.

1.1 Biodiesel

El biodiesel es un combustible sustituto del gasóleo o diésel de petróleo, compuesto por una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga (C14 - C22) que se obtienen por transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o lípidos de microalgas (Miao y Wu, 2006; Demirbas, 2009). El biodiesel como combustible puede utilizarse puro (100% o B100) o mezclado con diésel derivado del petróleo (BXX - donde XX indica el porcentaje de biodiesel en la mezcla); además suele emplearse en cualquier motor diesel con poca o ninguna modificación y no requiere nueva infraestructura de abastecimiento (Demirbas, 2009). El uso de biodiesel como recurso energético resulta atractivo porque se deriva de una fuente renovable que podría ser suministrada de manera sostenible (Huang y *col.*, 2010); por lo que disminuye la dependencia al petróleo y presenta diferentes ventajas frente al diésel ya que es biodegradable y menos tóxico (Miao y Wu, 2006; Xue y *col.*, 2006). Además el biodiesel no contiene compuestos aromáticos, tiene un perfil más favorable de gases de combustión (baja emisión de monóxido de carbono, azufre, partículas en suspensión e hidrocarburos sin quemar) (Halek y *col.*, 2009; Widjaja y *col.*, 2009; Huang y *col.*, 2010), su punto de ignición es relativamente alto (150°C, lo que lo hace menos volátil y más seguro de transportar o manejar), su número de cetano es mayor, (lo que otorga ventajas al proceso de combustión) y posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste de los motores extendiendo su vida útil (Huang y *col.*, 2010).

1.2 Generaciones de combustibles

Existen abundantes materias primas para la producción de biodiesel, la selección de éstas depende de la disponibilidad y los aspectos económicos de los países interesados en su producción; por lo que estas materias primas han sido evaluadas para la síntesis de biocombustibles y clasificado en generaciones de acuerdo a su naturaleza.

1.2.1 Primera generación (aceites comestibles)

Con la llegada de la era de biodiesel se comenzó con la utilización de materias primas muy apreciables para su producción que incluyen aceites provenientes de materia prima como la soja, mostaza, trigo, coco, colza, canola, oliva, palma y maíz; clasificados dentro de la primera generación de materias primas para la síntesis del biodiesel. Estas materias primas poseen ventajas como la disponibilidad de cultivos y procesos simples de conversión. El mayor inconveniente de esta materia prima es la amenaza de la limitación del suministro de alimentos que puede conducir a un incremento en los precios ya que el combustible deriva de ellos. En general surge la controvertida cuestión de qué buscamos: alimentos o combustibles. Por otro lado el costo elevado, una región restringida de cultivo y la adaptabilidad a las condiciones climáticas también obstruyen la utilización de materias primas de primera generación.

1.2.2 Segunda generación (aceites no comestibles)

Como resultado de las restricciones de las materias primas de primera generación se comenzaron a usar una variedad de cultivos no comestibles. Al combustible generado se le denominó biocombustible de segunda generación o biocombustible avanzado. Las materias primas incluye el aceite de *Jatropha*, *Mahua indica* (Mohamed y col., 2017), *Karanja*, *Neem*, semilla de caucho y *Thevetia peruviana*. La principal ventaja es que no habría incremento en precio de los cultivos alimentarios en comparación con la primera generación, además la materia prima de segunda generación puede ser cultivada en tierras no agrícolas o tierras marginales. Mientras tanto surge el problema del rendimiento de los cultivos ya que éste se ve perjudicado para cultivos principales de segunda generación como *Jatropha* y *Cammelina* cuando se cultivan en tierras marginales; por lo que los agricultores se ven obligados a cultivarlos en tierras agrícolas que a su vez afectan la producción de alimentos y la economía de la sociedad. De tal manera que para superar los problemas socioeconómicos los investigadores se han centrado en nuevas materias primas que sean económicamente viables y de fácil acceso (Sakthivel y Ramesh, 2018).

1.2.3 Tercera generación (otras fuentes)

Además de los aceites vegetales algunas otras fuentes como las microalgas, el aceite de freír, la grasa animal y el aceite de pirólisis constituyen una fuente de biocombustible de tercera generación (Verma y col., 2016). Estas fuentes viables superan las dificultades que enfrentan las materias primas de generaciones anteriores como la disponibilidad, viabilidad económica, la cadena alimentaria y la adaptabilidad a las condiciones climáticas. Las microalgas pueden ser una materia prima potencial para la producción de biodiesel adonde que varias especies de microalgas tienen la capacidad de vivir en condiciones de estrés y se adaptan mejor a los entornos locales con un bajo costo de cultivo. Otra ventaja importante de las microalgas es el contenido de lípidos, con un promedio de 70% para la mayoría de las especies; pero que bajo ciertas condiciones puede alcanzar hasta un 90% de peso seco para algunas especies (Mata y col., 2010).

1.3 Producción de lípidos en microalgas

El interés en las microalgas para la producción de biodiesel se debe a su alto contenido de lípidos en algunas especies y al hecho de que la síntesis de éstos, especialmente de triglicéridos (TG) no polares que son el mejor sustrato para la producción de biodiesel, puede ser manipulada por cambios en las condiciones de cultivo. Adicionalmente las microalgas poseen algunas ventajas sobre otras materias primas disponibles entre las que se pueden mencionar:

- Mayor eficiencia fotosintética que las plantas superiores (Meng y col., 2009; Posten y Schaub, 2009); logrando convertir entre el 3 y 8 % de la energía solar en biomasa, mientras que el rendimiento observado en las plantas es de aproximadamente 0.5 % (Lardon y col., 2009).
- Tasa de crecimiento elevada, duplicando su biomasa en aproximadamente 24 h (Meng y col., 2009).

— Periodos de cosecha muy cortos (menores a diez días dependiendo del proceso); lo que permite múltiples o continuas cosechas a diferencia de las plantas que se cosechan una o dos veces por año (Vyas y *col.*, 2010).

— Cálculos teóricos estiman que las microalgas tienen el potencial para producir mayor cantidad de biomasa y de aceite por hectárea que cualquier planta oleaginosa (Chisti, 2007; Mata y *col.*, 2010).

— Fácil cultivo, crecen casi en cualquier lugar y solo necesitan luz del sol y algunos nutrientes. Pueden cultivarse en zonas áridas y semi-áridas donde no pueden desarrollarse cultivos agrícolas, pueden utilizar agua no potable y su cultivo no requiere la adición de herbicidas o pesticidas (Avagyan, 2008).

— Capaces de fijar grandes cantidades de CO₂ (Amin, 2009; Sydney y *col.*, 2010), su demanda estequiométrica de CO₂ es de aproximadamente 1.7 kg de CO₂/kg de biomasa seca (Packer, 2009; Posten y Schaub, 2009; Rodolfi y *col.*, 2009); lo que permitiría acoplar su producción a una corriente de gases de combustión industrial para disminuir el efecto invernadero y contribuir al restablecimiento del equilibrio térmico del planeta (Lim y Teong, 2010).

— Capacidad para utilizar los nutrientes de aguas residuales en su crecimiento (especialmente nitrógeno y fósforo) (Xue y *col.*, 2006; Kim y *col.*, 2007; Chinnasamy y *col.*, 2010; Xin y *col.*, 2010a, Xin y *col.*, 2010b), lo cual podría disminuir el costo del medio de cultivo y evitar la descarga de estos nutrientes a cuerpos de agua.

— La biomasa residual, posterior a la extracción de los lípidos, encuentra aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica, agropecuaria e incluso en la producción de alcoholes combustibles y en la generación de energía (Wang y *col.*, 2008; Zamalloa y *col.*, 2012).

El principal reto para el desarrollo de un proceso de producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas es la obtención de los lípidos a un costo competitivo, esto puede lograrse a través de la selección de las mejores cepas y

condiciones de cultivo que permitan alcanzar la máxima productividad de lípidos con un perfil de ácidos grasos que otorgue calidad al biodiesel; además de la comercialización de diferentes subproductos como la torta de biomasa residual y la glicerina del proceso de transesterificación, así como la disminución de los costos de cosecha, extracción de lípidos y su conversión a biodiesel (Demirbas, 2003; Brennan y Owende, 2010). Es por lo anterior que los esfuerzos se han concentrado en el estudio de las condiciones de crecimiento de microalgas para aprovechar al máximo las ventajas que éstas ofrecen.

1.4 Crecimiento de microalgas

Las microalgas son organismos con la capacidad de desarrollarse empleando distintas formas de crecimiento como la autotrófica, heterotrófica y mixotrófica; entre otras.

1.4.1 Crecimiento autotrófico

Esta técnica es la más común de crecimiento, puede desarrollarse en estanques abiertos o en fotobiorreactores.

1.4.1.1 Crecimiento en estanques abiertos

Los estanques abiertos son el método más barato para la producción a gran escala de biomasa. Estos sistemas son categorizados dentro de las aguas naturales (lagos, lagunas y estanques), como también aguas residuales, estanques y contenedores artificiales. Son generalmente construidos junto a plantas de energía o industria pesada con masiva descarga de dióxido de carbono donde la biomasa absorbe nitrógeno de la atmósfera en forma de NO_x (Richmond 1993; Brenan y *col.*, 2010). Por otro lado, los sistemas de estanques abiertos tienen algunas limitaciones ya que requieren un control ambiental estricto para evitar el riesgo de contaminación, evaporación del agua, bacterias invasoras y el

crecimiento de otras especies de algas. Además, las diferencias de temperatura debidas al cambio estacional no pueden ser controladas y la concentración de CO₂ y el exceso de exposición a la luz solar son difíciles de manejar. Por otra parte cerca del final de la fase de crecimiento exponencial, algunas células no están suficientemente expuestas a la luz del sol porque otras células que flotan cerca de la superficie los cubren; lo que conduce a menores rendimientos masivos. Por lo tanto, la agitación del medio es preferible y actualmente se practica (Safi y col., 2014).

1.4.1.2 Fotobiorreactor cerrado

Esta tecnología se implementó principalmente para superar algunos factores limitantes de los sistemas de estanques abiertos, aumentando biomasa en un ambiente controlado (pH, intensidad de luz, temperatura y concentración de dióxido de carbono) para obtener una mayor concentración celular; además, estos sistemas son más apropiados para cepas que no pueden competir y crecer en ambientes hostiles. La biomasa se alimenta con CO₂ que viene burbujeado por tubos. Las luces fluorescentes se utilizan en caso de que los tubos no sean suficientemente expuestos a la luz solar. Los tubos son generalmente de 20 cm o menos de diámetro (Chisti Y., 2007) y el espesor de sus paredes transparentes es de algunos milímetros, permitiendo la absorción de luz. Por lo tanto se han utilizado y probado múltiples diseños: fotobiorreactor de placa plana (Qiang y col., 1996; Zhang y col., 2001), fotobiorreactor tubular (Molina y col., 2003) y columna fotobiorreactor (Kojima y col., 1999); alcanzando 0.11 g L⁻¹ h⁻¹ (Degen y col., 2001) de productividad de biomasa seca después de cultivar las células de *C. vulgaris* en un fotobiorreactor de puente aéreo de panel plano bajo iluminación continua (980 μE m² s⁻¹). No obstante las principales desventajas de un sistema cerrado son el costo de la construcción sofisticada, limitada área de iluminación y los costos de esterilización (Lee Y, 2001).

1.4.2 Crecimiento heterotrófico

Esta técnica no requiere luz y la biomasa se alimenta con fuente de carbono orgánico. Por lo tanto, las microalgas se cultivan en un biorreactor de tanque agitado o fermentador donde hay un mayor grado de crecimiento esperado y un bajo costo de cosecha debido a la mayor productividad de biomasa seca alcanzada (hasta $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$); obteniendo además una alta acumulación de lípidos en el rango de $22\text{-}54 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Martínez y col., 1991; Lian y col., 2009; Ogawa y col., 1981). Las fuentes de carbono utilizadas son glucosa, acetato, glicerol y glutamato con una máxima tasa de crecimiento específica obtenida con glucosa. Sin embargo la principal desventaja de este sistema es el precio y la disponibilidad de azúcares que compiten con las materias primas para otros usos tales como producción de alimentos y otros biocombustibles.

1.4.3 Crecimiento mixotrófico

Algunas clases de microalgas son capaces de combinar formas autotróficas y heterotróficas al realizar la fotosíntesis además de la ingestión de materiales orgánicos como la glucosa (Lian y col., 2009; Yeh y col., 2012). Por lo tanto, las células no son estrictamente dependientes de la luz o del sustrato orgánico para crecer. Esta técnica compite favorablemente con sistemas autotróficos y, de acuerdo con estudios previos, las condiciones mixotróficas muestran un alto nivel de humedad, alta productividad de biomasa ($2\text{-}5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y elevada productividad de lípidos ($67\text{-}144 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) en microalgas como *C. vulgaris* (Yeh y col., 2012). Las principales ventajas del metabolismo mixotrófico están limitando el impacto de la pérdida de biomasa durante la respiración y reduciendo la cantidad de sustratos orgánicos utilizados para crecer la biomasa.

1.4.4 Otras técnicas de crecimiento

El crecimiento de microalgas puede tomar una dimensión adicional mediante la co-inmovilización con una bacteria que crece en las plantas, denominada *Azospirillum brasilense*, en cuentas de alginato (Gonzales y col., 2000; de-Bashan y col., 2005). Esta técnica ha sido extrapolada a *C. vulgaris* y otras microalgas con la hipótesis de que *A. brasilense* promueve el crecimiento de la planta terrestre al interferir con el metabolismo hormonal de la planta huésped y proporciona O₂ para que la bacteria biodegrade los contaminantes y, posteriormente, la microalga consuma CO₂ liberado de la respiración bacteriana (Muños y col., 2006). En consecuencia, dependiendo de la cepa de *C. vulgaris* (de-Bashan y col., 2002) esta técnica tiene un impacto en la prolongación de la vida de la microalga; mejorando la producción de biomasa, aumentando el tamaño de la célula (62% más grande) y acumulando pigmentos y lípidos. Simultáneamente se mejora la absorción de zinc, cadmio, fósforo, nitrógeno y otros metales pesados en aguas residuales (Lebsky y col., 2001).

Las técnicas de crecimiento previamente mencionadas pueden ser aplicadas para cualquier tipo de microalga, por lo cual la elección de la técnica dependerá enteramente del producto que se desea obtener así como de los insumos disponibles. De esa manera la extrapolación de las técnicas hacia una clase de microalga como *Scenedesmus* es muy viable para favorecer el incremento en el contenido de lípidos de dicha cepa. La mejor técnica será la que satisfaga la demanda nutricional así como las condiciones de crecimiento; por lo que es de suma importancia el conocimiento previo de la cepa con la que se trabaja. Dado que para los fines de esta investigación se trabajara con el género *Scenedesmus* es preciso señalar las características que esta microalga presenta.

1.5 Características de *Scenedesmus*

Se ha descrito que *Scenedesmus* es un alga cenobial muy común que frecuentemente se presenta como un cultivo puro en el plancton. Las células en la colonia se organizan en múltiplos de dos, las especies más comunes presentan cuatro u ocho células. Las células son elipsoides, ovoides o en forma de media luna; la pared celular es lisa y no presenta espinas. Esta es probablemente el filo de *Chlorococcales* más abundante en aguas ricas en nutrientes, especialmente con un alto contenido de nitrógeno. La reproducción, que en muchas especies es totalmente asexual, se realiza mediante la formación de autocolonias en el interior de cada célula adulta. Dichas autocolonias quedan en libertad por ruptura de la pared de la célula madre y después alcanzan gradualmente el tamaño y la ornamentación característica de la especie (González, 2010).

1.6 Efecto de las condiciones de crecimiento en la producción de lípidos en microalgas.

Las microalgas se han examinado ampliamente como posibles fuentes de lípidos para producir biodiesel. Además de los aceites, la biomasa de microalgas contiene proteínas, carbohidratos y otros materiales. En consecuencia las microalgas son fuentes potenciales de alimentos, piensos y materia prima para generar diversos productos químicos y combustibles (Shene y *col.*, 2016).

Varios estudios ha reportado que la cantidad y calidad de lípidos contenidos en las células de microalgas pueden diferir como resultado de cambios en las condiciones de crecimiento (temperatura, intensidad de luz, etc.), tipo de reactor y características del medio de crecimiento (concentración de carbono, nitrógeno, fosfato, hierro, etc.) (Illman y *col.*, 2000; Liu y *col.*, 2008). El cambio de las condiciones genera estrés en las microalgas favoreciendo la acumulación de lípidos para la producción de biodiesel.

La acumulación de lípidos es crítica en la producción de biodiesel a partir de microalgas ya que transforman la luz solar en energía química (ATP y NADPH) que se utiliza en el ciclo de reducción de carbono fotosintético, ciclo de Calvin-Benson, para producir carbono orgánico (Shene y *col.*, 2016). Las microalgas pueden acumular hasta un 80% de triacilglicerol (TAG) de peso seco (PS), por lo que se consideran una de las fuentes renovables más prometedoras para biocombustibles en comparación con otros cultivos oleaginosos (como maíz, soja, palma de aceite, etc.) (Shen y *col.*, 2014).

Para mejorar la viabilidad de la producción de biocombustibles a base de microalgas, es necesario mejorar tanto la productividad de la biomasa como el contenido de lípidos.

Blair y *col.*, (2014) describen que para favorecer el crecimiento de microalgas se deben considerar la luz (energía), fuente de carbono (CO₂ para metabolismo autótrofo), medio de crecimiento (agua) y nutrientes (nitrógeno y fósforo) para la reproducción.

En general la biosíntesis de lípidos a menudo se desencadena en condiciones de estrés (Parisien y *col.*, 2009). En estudios realizados por Renaud y *col.* (2001), las microalgas como *Isochrysis sp*, *Prymnesiophyte*, *Rhodomonas*, *Cryptomonas* y *Chaetoceros* muestran que la acumulación de lípidos se ve favorecida en un rango de temperatura de 25-30°C, además de que los lípidos obtenidos fueron ácidos grasos saturados ideales para la conversión a biodiesel. Otro de los factores que influye en la biosíntesis de lípidos es la fuente de luz, Blair y *col.*, (2014) realizaron un estudio en el que probaron distintas longitudes de onda (roja a 650 nm, azul a 475 nm, verde a 510 y luz blanca) y observaron un efecto notable en la tasa de crecimiento de las microalgas, demostrando que la luz blanca y la luz azul muestran una tendencia positiva en la tasa de crecimiento en comparación con la luz verde y roja.

1.7 Efecto de los nutrientes en el cultivo de microalgas

Las microalgas requieren diversos nutrientes para su crecimiento; entre los que se encuentran el carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y sal (NaCl). Estos nutrientes pueden ser modificados para favorecer el aumento de biomasa y la biosíntesis lipídica, ya sea en exceso o déficit de éstos.

1.7.1 Efecto de la fuente de carbono (C) en el crecimiento de microalgas

El carbono es un elemento esencial del crecimiento de microalgas. Las microalgas tienen la capacidad de usar fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas. Los autótrofos consumen compuestos inorgánicos y los heterótrofos consumen carbono orgánico como fuente de carbono (Ullrich y *col.*, 1998). Los autótrofos fijan el carbono en presencia de luz, llamados fotoautótrofos. La fijación de CO₂ depende de la energía de la luz. Se requiere una energía de luz de 1338 kJ para fijar un átomo de carbono; sin embargo, la eficiencia fotosintética aumenta al aumentar el nivel de CO₂.

El aire enriquecido con CO₂ se usa comúnmente para reducir el pH del cultivo que de lo contrario aumentaría como consecuencia de la captación de nutrientes tales como HCO₃⁻ y NO₃⁻ (Ullrich y *col.*, 1998). Además el pH también puede afectar la tasa de crecimiento de las microalgas al influir en las tasas de reacciones bioquímicas y las propiedades de la membrana celular (Taraldsvik y *col.*, 2000). Se ha observado que bajo presión ambiental cesa la división celular de microalgas y la síntesis de CO₂ se desvía a síntesis de lípidos como medida de almacenamiento de energía; por lo que aumenta el contenido de lípidos por biomasa de microalgas (Xin y *col.*, 2010).

1.7.2 Efecto del nitrógeno (N) en el desarrollo de microalgas

El N es esencial para muchos de los componentes funcionales de las algas; incluidas proteínas estructurales y enzimas, ácidos nucleicos, clorofila y moléculas

de transporte de energía (Cai y col., 2013; Procházková y col., 2014). Esto conduce a un alto requerimiento de N, sin embargo la mayoría de las especies de algas no exhiben almacenamiento de N estructural (Procházková y col., 2014). La célula de alga puede adaptarse para asimilar N según sea necesario en función de la forma y la concentración disponibles (Sanz-Luque y col., 2015).

La limitación de N causaría tres cambios en las microalgas: disminución del contenido celular de la membrana tilacoidal, activación de la acil hidrolasa y estimulación de la hidrólisis de los fosfolípidos (Takagi y col., 2000). Estos cambios pueden aumentar el contenido intracelular de ácido graso acil-CoA; por lo que la limitación de N podría aumentar el contenido de lípidos y TAG en las células de microalgas (Xin y col., 2010).

1.7.3 Efecto del fósforo (P) en el crecimiento de microalgas

El P se utiliza en algas para una serie de componentes incluidos fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos; además es fundamental para el ciclo de energía de las células de algas (Cai y col., 2013; Procházková y col., 2014). Los mecanismos de captación, así como su uso en las células de algas dependen de la concentración de P en el agua (Solovchenko y col., 2016). Existe un fenómeno común de absorción de P adicional, más allá de lo requerido para el crecimiento celular, almacenado en forma de polifosfato; conocido como captación de lujo (Powell y col., 2009), esto se promueve cuando el pH es básico lo que puede ocurrir debido al crecimiento de algas (Cai y col., 2013).

1.7.4 Efecto de la salinidad

Varios estudios sugieren que el estrés por salinidad puede mejorar la producción de lípidos de algas (BenMoussa-Dahmen y col., 2016; Mohan y Devi., 2014). Heredia-Arroyo y col., (2011) reportaron que el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* aumentó de 15.4 a 25.6 % utilizando 35 g de NaCl por litro de medio de cultivo en lugar de no usar NaCl; sin embargo el crecimiento de algas se inhibió

totalmente con esta cantidad de NaCl. Resultados similares del efecto de la salinidad sobre el contenido lipídico también se observaron en concentraciones de salinidad más bajas, donde el contenido total de lípidos aumentó de 15.2 a 23.4 % cuando la concentración de NaCl aumentó de 0 a 1 g L⁻¹ de NaCl (Mohan y Devi, 2014).

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

Debido a la explotación excesiva de las reservas petrolíferas y a la gran demanda de diésel fósil en el transporte, es necesario el uso de una alternativa sustentable que permita obtener un combustible homólogo al diésel, como el biodiesel, con las respectivas ventajas medioambientales y de sustentabilidad que se requieren hoy en día. Para lo anterior se propone el uso de *Scenedesmus acutus* como una alternativa para la producción de lípidos que puedan utilizarse para generar biodiesel. Dado que el uso de las microalgas puede representar una alternativa viable para la síntesis de biodiesel es necesario el estudio de las condiciones de crecimiento que favorezcan el incremento de biomasa así como un alto contenido de lípidos en las células de microalgas. Asimismo, diversos estudios han demostrado que otros filos de microalgas generan una gran cantidad de biomasa y lípidos si son sometidas a un estrés de nutrientes como lo son el fósforo (P), el nitrógeno (N) y la salinidad (NaCl) en ambientes mixotróficos, dado que este tipo de ambientes no generan costos extras por la adición de una fuente de carbono orgánica.

2.1.1 Hipótesis

La variación de la concentración inicial de nutrientes como el nitrógeno (N) y el fósforo (P) y de la salinidad en el medio de cultivo Basal Bold favorecerá el crecimiento de la biomasa y la generación de ácidos grasos ideales para la conversión a biodiesel en la microalga *S. acutus*.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Generar un incremento de biomasa y ácidos grasos en el cultivo de la microalga *S. acutus* mediante la modificación de la concentración inicial de nutrientes en el medio de crecimiento Basal Bold.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Realizar un diseño de experimentos que permita evaluar los cambios en la concentración inicial de nutrientes (N, P y NaCl) del medio de cultivo Basal Bold y determinar el crecimiento de *S. acutus* en fase de adaptación y fase exponencial.
2. Construir un sistema que suministre una cantidad constante de aire como fuente de CO₂ para promover el crecimiento celular de *S. acutus* de forma mixotrófica.
3. Cultivar las células de *S. acutus* en medio Basal Bold modificando las concentraciones iniciales de nitrógeno, fósforo y cloruro de sodio.
5. Cuantificar la cantidad de proteínas en la biomasa
6. Determinar el desarrollo de *S. acutus* mediante la cuantificación de clorofila "A"
7. Extraer los lípidos totales y obtener el perfil de ácidos grasos.

Capítulo 3

METODOLOGÍA

3.1.- Diseño de experimentos.

Diferentes variables afectan directamente el crecimiento de las microalgas como temperatura, luz, fuente de carbono y fuente de nutrientes; entre otras. En el presente estudio se evaluó la modificación de la concentración inicial de nutrientes para lo que se realizó un diseño de experimentos factorial considerando tres variables: N, P y NaCl en tres niveles de concentración: 0, 50 y 100% con respecto al contenido presente en el medio Basal Bold, obteniendo un diseño factorial 3^3 . Con la ayuda del Software *STATISTICA 7* el diseño se fraccionó (3^{3-1}) reduciéndose a 9 condiciones experimentales (Tabla 1). Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas con la prueba f-Fisher ($P < 0.05\%$). En la Tabla 1 se observa el diseño factorial que se obtuvo del diseño de experimentos.

Tabla 1. Diseño de experimentos factorial fraccionado para evaluar el efecto del N, P y NaCl para la generación ácidos grasos y biomasa en *Scenedesmus acutus*

Condiciones experimentales			
EXP	N%	P%	NaCl%
I	0	0	0
II	0	50	100
III	0	100	50
IV	50	0	100
V	50	50	50
VI	50	100	0
VII	100	0	50
VIII	100	50	0
IX	100	100	100

3.2 Construcción del sistema de aireación

Se construyeron tres sistemas de aireación para suministrar aire a cada uno de los matraces del experimento como se representa en la Figura 1.

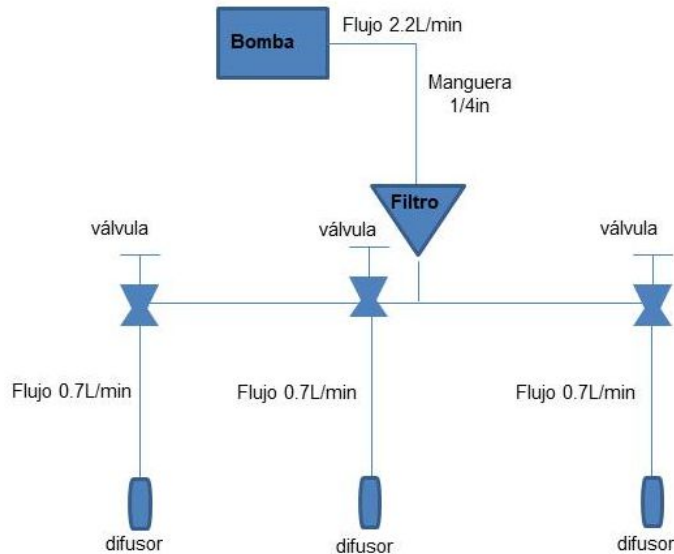


Figura 1. Representación del sistema de alimentación de aire para los experimentos de la Tabla 1

Como se observa en la Figura 1, cada sistema suministro aire a tres matraces con un flujo constante de 0.7 L min^{-1} el cual fue medido por desplazamiento de agua utilizando una probeta. Cada uno constaba de una bomba (HAGEN/HA802 Elite 802) y un filtro que evito la entrada de partículas a los matraces con medios de cultivo. Los difusores se generaron utilizando tubos Eppendorf de 0.2 mL con las paredes perforadas, lo que permito aumentar la superficie de contacto del aire con el medio de cultivo gracias a que se redujo el tamaño de la burbuja de aire formada en los medios.

3.3 Condiciones del cultivo para *Scenedesmus acutus*

El cultivo se realizó utilizando como base la fórmula del medio Basal Bold (CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll, PA37 1QA, UK) (Tabla 2) en el que se modificó la cantidad total de nitrógeno (N), fósforo (P) y sal (NaCl) de acuerdo al diseño de experimentos. Se prepararon 9 matraces de 1 L con 800 mL de medio de cultivo, los cuales se esterilizaron y se inocularon con 0.07 g L^{-1} de peso fresco de *Scenedesmus acutus* a un pH de 6.5. Los 9 experimentos se mantuvieron a una temperatura de

25±2°C con un fotoperiodo de 16 h/8 h (luz/oscuridad). A los matraces se les señaló el nivel de volumen de medio de cultivo para reponer el agua evaporada arrastrada por el flujo de aire inyectado en los cultivos. Cada experimento se realizó por duplicado.

Tabla 2. Medio de cultivo Basal Bold

Macronutrientes	Concentración	Micronutrientes	Concentración
NaNO ₃	25 g L ⁻¹	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.8 mg L ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7.5 g L ⁻¹	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44 mg L ⁻¹
NaCl	2.5 g L ⁻¹	Na ₂ MoO ₄	1.18 mg L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	7.5 g L ⁻¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	18 g L ⁻¹	CoCl ₂	0.402 mg L ⁻¹
CaCl	2.5 g L ⁻¹	H ₃ BO ₃	11.42 mg L ⁻¹
		EDTA	50 mg L ⁻¹
		KOH	31 mg L ⁻¹
		FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98 mg L ⁻¹
		H ₂ SO ₄ (Concentrado)	0.001 mL L ⁻¹

3.4 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se monitoreó mediante la medición de la densidad óptica a una absorbancia de 750 nm en un espectrofotómetro (GloMax - Multi Detection System (Promega Corporation, Madison, WI, USA)), para lo cual se tomó muestra (1.5 mL) de cada uno de los 9 experimentos por triplicado. 0.2 mL de la muestra se utilizaron para medir absorbancia y el resto fue almacenado a -4°C. La absorbancia se midió cada 24 h durante las fases lag y exponencial y al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento de *S. acutus*. A cada experimento se les señaló el volumen después de muestrear y a los que presentaban pérdidas por evaporación se les adicionó agua destilada para recuperar el volumen previo a cada muestreo. La cinética se realizó por duplicado para cada una de las condiciones experimentales.

3.5 Pruebas de lisis celular

Se realizaron distintas pruebas para la ruptura de la membrana celular, para esto se usó un equipo de ultrasonificación (Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processors (Sonics & Materials, Inc.) (GEX130PB)(130W)(20kHz)(USA)). Para romper la célula de *S. acutus* se utilizó una muestra de 1.5 mL y se colocó en el ultrasonicador. La potencia del ultrasonicador se varió desde 20 hasta 60% con incrementos del 10% en la potencia, utilizando lapsos de 10 s de ultrasonificación y 5 s de reposo durante 5 ciclos manteniendo la muestra en hielo. Por cada aumento de la potencia en el ultrasonicador se tomó una alícuota de 50 µL y se colocó en un porta objetos para su observación al microscopio a 600×.

3.6 Cuantificación de proteínas de *S. acutus*

La determinación de proteínas se midió para monitorear la actividad celular usando el método de Bradford (1976), el cual consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, formando un complejo proteína-colorante, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (GloMax - Multi Detection System (Promega Corporation, Madison, WI, USA)), a 595 nm. Cada análisis se realizó por duplicado.

3.7 Extracción y cuantificación de clorofila de *Scenedesmus acutus*

Para la extracción de clorofila se tomaron las muestras de 1.3 mL, resultantes del análisis de absorbancia, de los días 4, 9, 14 y 18 de la cinética de crecimiento de cada uno de los 9 experimentos. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min para concentrar las microalgas y separarlas del sobrenadante, la biomasa resultante fue pesada en fresco y ultrasonificada al 60% de potencia, las células lisadas resultantes se resuspendieron en acetona/agua (4:1 vol/vol); para después dejarlas en reposo por 24 h en oscuridad y a -20°C.

La concentración de clorofila fue medida en un espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY Serie 67 (Cole-Parmer, Beacon Road, Stone, Staffordshire, ST15 OSA, UK)) que fue calibrado entre cada medición usando acetona/agua (4:1 vol/vol) como blanco. Cada muestra fue mantenida en oscuridad y a baja temperatura durante todo el análisis por lo que se cubrieron con aluminio y se mantuvieron en hielo. Para medir la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro, se tomó una alícuota de 100 μL y se colocó en una celda de cuarzo de 1 mL que se aforó con 0.9 mL de acetona en agua al 80% (vol/vol); la absorbancia se midió a 663, 645 y 750 nm. La concentración de clorofila (en unidades mg/mL) se calculó mediante la siguiente fórmula, de acuerdo con el protocolo reportado por Arnon (1949). Cada análisis se realizó por duplicado

$$\text{Clorofila } a = \frac{\left((12.7 \times \text{Abs}(663 \text{ nm})) - (2.7 \times \text{Abs}(645 \text{ nm})) \right) (\text{mL acetona})}{g \text{ peso fresco}}$$

3.8 Extracción de lípidos totales

Para la extracción de lípidos totales se utilizó la biomasa total resultante al final de la cinética de crecimiento de cada uno de los 9 experimentos. Para realizar la extracción se midió el volumen total de cada uno de los matraces y se centrifugaron las suspensiones a 10000 rpm durante 10 min para concentrar la biomasa al separar el sobrenadante. La biomasa recuperada de cada experimento se colocó en un tubo de 50 mL y se introdujo a una estufa a 70°C. Posteriormente al obtener la biomasa seca, se pesó y resuspendió en 2 mL de agua destilada. La biomasa resuspendida se sometió a ultrasonificación al 60% por 5 ciclos de 10 s/5 s (ultrasonificación/descanso) evitando el calentamiento de la muestra. Después de la ultrasonificación se agregaron 10 mL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1 vol/vol) a cada una de las muestras y se dejó reposar por 24 h a -20°C.

Una vez pasadas las 24 h se le adicionó a las muestras un exceso de solución de NaCl al 0.09% (peso/peso) y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min, terminada la centrifugación las dos fases formadas en la muestra se separaron y la fase acuosa fue desechada. La fase clorofórmica recuperada después del

centrifugado se conservó en un tubo de 50 mL y se introdujo en un horno a 70°C hasta que el cloroformo se evaporó por completo. Cada experimento se realizó por duplicado

3.8.1 Perfil de ácidos grasos

A los lípidos totales extraídos se les realizó una derivatización FAME (Fatty acid methyl ester) para identificar la concentración de SFA (ácidos grasos saturados), MUFA (ácidos grasos monoinsaturados), PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) y Otros (ácidos grasos no identificados en el cromatograma) para así identificar los ácidos grasos que resultan de utilidad en la conversión a biodiesel. Los metil ésteres de ácidos grasos resultantes de la derivatización se analizaron mediante un equipo de cromatografía de gases (GC) Agilent 7890 (Agilent Technologies, Sta. Clara, Cal., USA) equipado con un detector de ionización de flama. Las mezclas fueron metiladas siguiendo el método oficial AOCS Ce2-66 (AOCS, 1997) y la separación se realizó con el método AOCS Ce 1e-91, se utilizó una columna capilar (100 m×0.25 µm×0.2 µm) inyectando 1 µL de muestra en modo split con una relación 100:1. La temperatura de la columna fue de 180°C, la del detector 250°C y la del inyector 215°C; utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹. Los ácidos grasos obtenidos fueron identificados por comparación del tiempo de retención con estándares (Sigma-Aldrich GLC20 y GLC-70) de ácidos grasos. Cada análisis se realizó por duplicado.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño experimental

Diferentes estudios han comprobado que la variación de N, P y NaCl es importante para el incremento de lípidos y biomasa en microalgas, sin embargo actualmente no se ha establecido en *Scenedesmus acutus* la mejor relación de nutrientes que favorezcan el incremento de lípidos y el desarrollo celular. En este proyecto se propuso un diseño de experimentos factorial fraccionado (3^{3-1}) con el que se elucidaron diferentes condiciones de concentraciones iniciales de nutrientes (N, P y NaCl). En la Tabla 1 podemos observar el resultado del diseño.

Tabla 3. Diseño factorial fraccionado para las diferentes concentraciones de nutrientes

Condiciones experimentales			
EXP	N %	P %	NaCl %
I	0	0	0
II	0	50	100
III	0	100	50
IV	50	0	100
V	50	50	50
VI	50	100	0
VII	100	0	50
VIII	100	50	0
IX	100	100	100

En la tabla 3, hay un total de 9 experimentos de los cuales los valores de la concentración inicial de nutrientes se modificaron entre un 0 %, 50 % y 100 % para N: P: NaCl.

Las concentraciones de los nutrientes se modificaron a partir de la formulación del medio Basal Bold (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de N, P y NaCl (mg L⁻¹) establecidas a partir del diseño experimental con base en la concentración del medio Basal Bold

Condiciones experimentales			
EXP	N (mg L⁻¹)	P (mg L⁻¹)	NaCl (mg L⁻¹)
I	0	0	0
II	0	3.145	2.5
III	0	6.29	1.25
IV	2.05	0	2.5
V	2.05	3.145	1.25
VI	2.05	6.29	0
VII	4.1	0	1.25
VIII	4.1	3.145	0
IX	4.1	6.29	2.5

En el medio Basal Bold se utiliza la concentración óptima de 4.1 mg L⁻¹ de N, 6.29 mg L⁻¹ de P y 2.5 mg L⁻¹ de NaCl el cual está representado en el experimento IX (control). De acuerdo al diseño experimental las 8 condiciones restantes variaron su concentración (Tabla 4).

4.2 Sistema de aireación para suministro de CO₂

El sistema de aireación permitió el suministro CO₂ ambiental a los cultivos como fuente de carbono, lo que favoreció el crecimiento mixotrófico de *S. acutus*. La figura 2 muestra el sistema de aireación final, antes de ser utilizado en la experimentación.

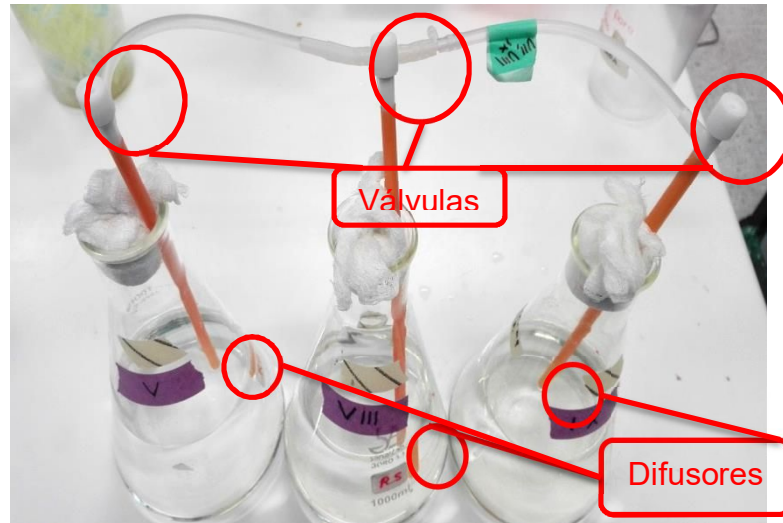


Figura 2. Sistema de aireación final utilizado en la experimentación

Este sistema de aireación permitió que la distribución de aire fuera homogénea en todos los experimentos realizados.

4.3 Cinética de crecimiento para *Scenedesmus acutus*

De los resultados de las mediciones de cinética de crecimiento para *S. acutus* por espectrofotometría (UV-Vis a 750 nm) se obtuvo la gráfica correspondiente (Fig. 3).

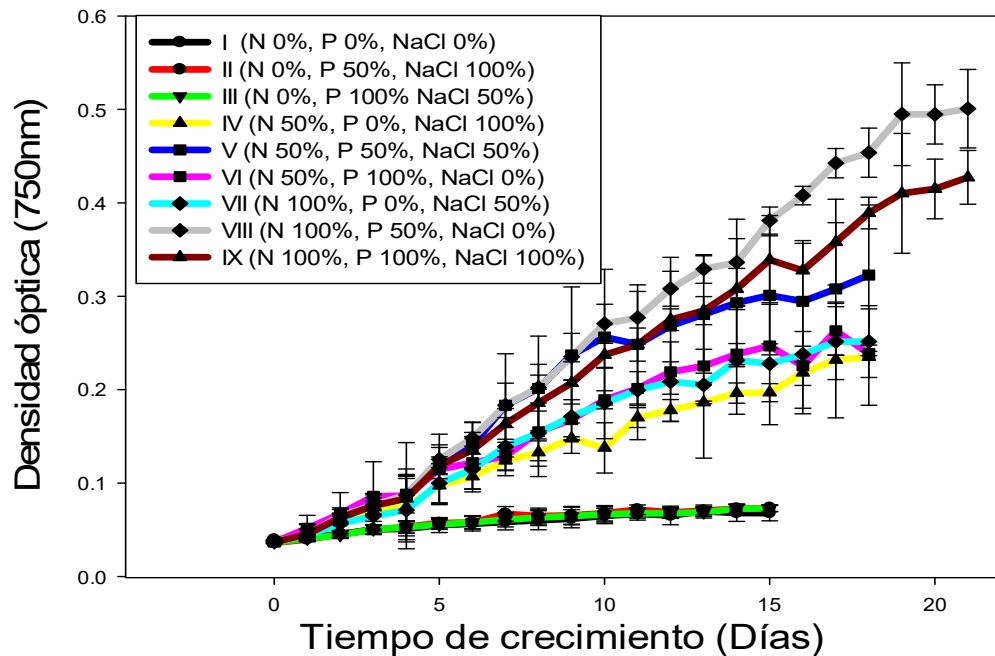


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutus* con distintas concentraciones de N, P y NaCl.

Como se observa en la Figura 3, en el experimento I (N 0 %, P 0 %, NaCl 0 %) *S. acutus* no presenta crecimiento, este resultado era esperado debido a la ausencia de macronutrientes (N, P, NaCl); de igual manera, en los experimentos II (N 0 %, P 50 %, NaCl 100 %) y III (N 0 %, P 100 %, NaCl 50 %), tampoco se observa crecimiento a pesar de contar con P y NaCl en menores cantidades, pero sin fuente de N. Barsanti y Gualtieri (2006) indican que la limitación de nitrógeno influye directamente en la formación de aminoácidos, lo que conlleva a limitar la traducción del ARNm y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas, lo cual trae por consecuencia un cese del crecimiento de la microalga.

Hessen y *col.*, (2002) y Barsanti (2006) demostraron que la deficiencia de fósforo puede ocasionar la limitación del crecimiento algal que se produce debido a una disminución de la síntesis de ácidos nucleicos, esto puede darse a nivel de la replicación del genoma o a nivel de la síntesis de ARN. Otro punto importante que puede ocasionar la escasez de P es limitar la conversión de energía

reduciendo la tasa de síntesis de proteínas en el cloroplasto; resultando en un efecto negativo en el proceso de fotosíntesis. Al presentarse altas tasas de crecimiento se aumenta la demanda de ARN, particularmente de ARN ribosomal; por lo tanto la deficiencia de P deriva en menores tasas de crecimiento. De acuerdo a los resultados obtenidos de los experimentos IV (N 50 %, P 0 % y NaCl 100 %), V (N 50 %, P 50 % y NaCl 50 %), VI (N 50 %, P 100 % y NaCl 0 %), VII (N 100 %, P 0 % y NaCl 50 %) y VIII (N 100 %, P 50 % y NaCl 0 %); al compararlos con el control (Exp IX (N 100 %, P 100 % y NaCl 100 %)) se puede visualizar la importancia del N y P, sin embargo el crecimiento de *S. acutus* también se ve afectada por la concentración de NaCl. La salinidad es un factor limitante del crecimiento que afecta directamente la productividad de biomasa de las microalgas; debe tenerse en cuenta que los efectos son altamente específicos de cada especie (Cho y col., 2007).

De acuerdo con lo anterior, el experimento VIII (N 100 %, P 50 % y NaCl 0 %) presentó el mayor crecimiento de todas las pruebas incluyendo el control (Exp IX (N 100 %, P 100 % y NaCl 100 %)). Los experimentos IV (N 50 %, P 0 % y NaCl 100 %) y VII (N 100 %, P 0 % y NaCl 50 %), a pesar de la concentración de N en el medio y de no contener P, muestran una diferencia en su crecimiento que puede ser atribuida a la concentración presente de NaCl.

Se realizó un análisis estadístico del diseño de experimentos (ANOVA/ F de Fisher) para evaluar el efecto del N, P y NaCl. Los resultados para el efecto del N se muestran en la Figura 4.

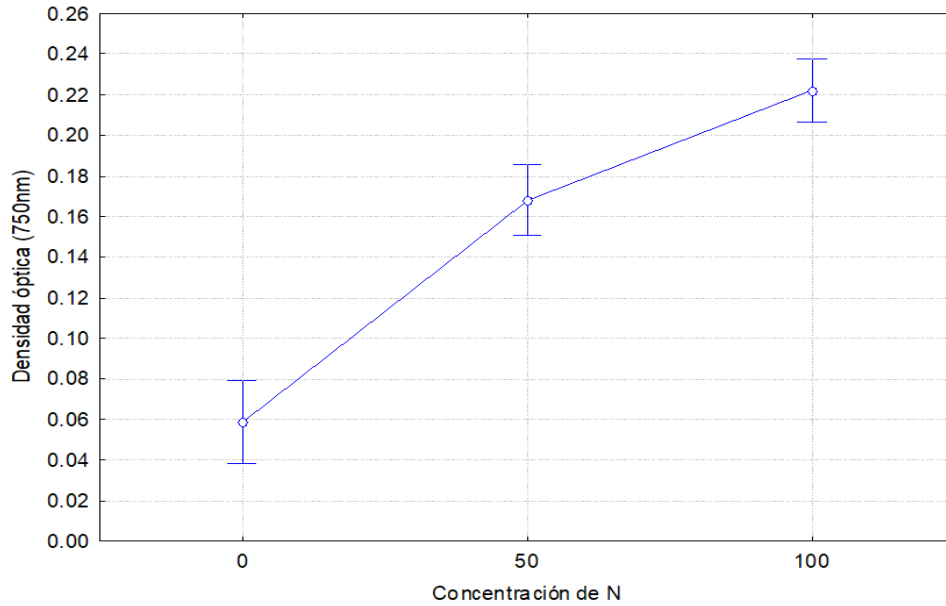


Figura 4. Efecto de la concentración de N (0 %, 50 % y 100%) en el crecimiento *S. acutus*

Existe un incremento en la densidad celular de hasta un 45% en concentraciones que van de 0-50% de N, mientras que de 50-100% de N el aumento fue de hasta un 27% (Fig. 4). En el análisis se comprueba la importancia de la concentración de N, esto se ve reflejado en el crecimiento celular de *S. acutus* en los 9 experimentos analizados.

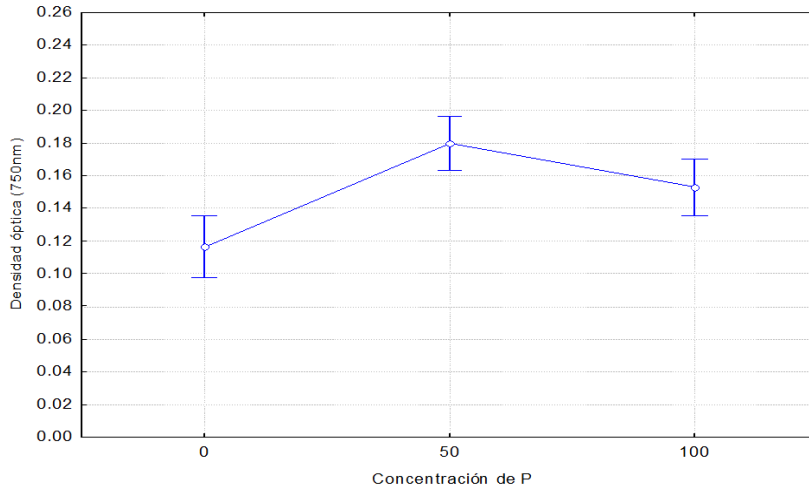


Figura 5. Efecto de la concentración del P (0 %, 50 %, 100 %) en el crecimiento de *S. acutus*.

Como se observa en la Figura 5 en ausencia de P (0%) el crecimiento celular se ve afectado, esto podría deberse a la disminución de la actividad fotosintética de acuerdo a lo reportado con Barsanti y Gualtieri (2006); de la misma forma se comprobó con los experimentos IV (N 50 %, P 0 % y NaCl 100 %) y VII (N 100 %, P 0 % y NaCl 50 %). Para concentraciones de 50 y 100 % la diferencia no es significativa ($P > 0.05$), sin embargo el crecimiento celular es mayor que en concentraciones de 0 %.

El efecto de la concentración de NaCl sobre la cinética de crecimiento se presenta en la Figura 6.

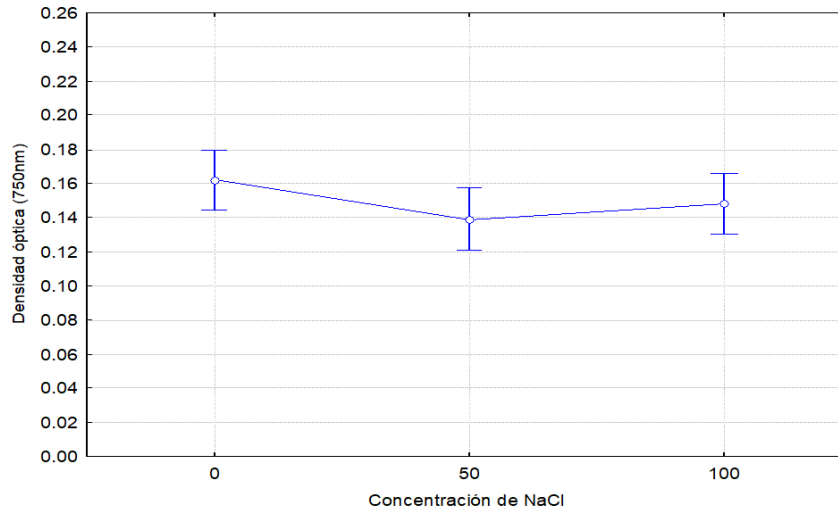


Figura 6. Efecto de la concentración de NaCl (0 %, 50 %, 100 %) en el crecimiento de *S. acutus*

El efecto del NaCl no representa diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto a la concentración utilizada en los experimentos, esto se ve reflejado en el crecimiento celular de *S. acutus* y puede deberse a la tolerancia intrínseca de la microalga (Fig.6).

4.4 Cuantificación de proteínas solubles en *Scenedesmus acutus*

La cuantificación de proteínas se realizó con la finalidad de monitorear el estado de *S. acutus* ya que éstas son de suma importancia en la fijación de carbono y la división celular. El análisis de proteínas solubles no se realizó para los experimentos I, II y III debido a que no presentaron crecimiento celular significativo. Los resultados que se muestran en la Figura 7 corresponden a los experimentos IV al IX, el análisis se realizó a partir del día 4 ya que es cuando se comenzó a observar acumulación significativa de biomasa; después de esto se realizó cada 5 días hasta el término de la cinética.

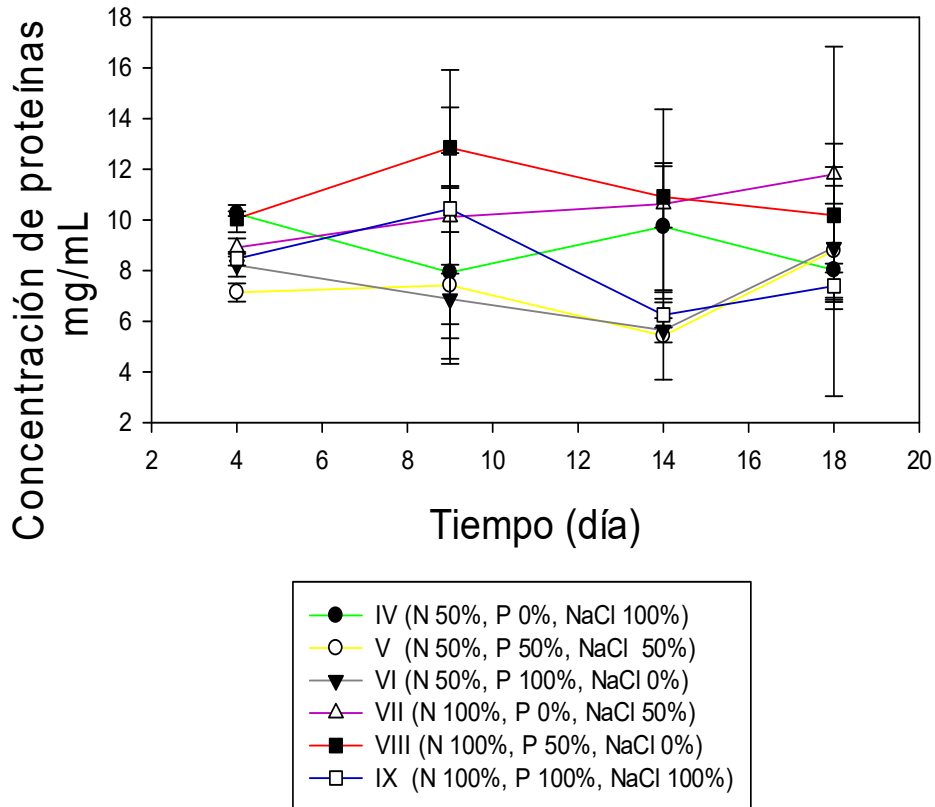


Figura 7. Determinación de proteínas solubles en *S. acutus*

En la Figura 7 se observa un comportamiento distinto para cada experimento. En el experimento IV se observan fluctuaciones en la concentración de proteínas durante toda la cinética. El experimento V no mostró aumento significativo ($P > 0.05$) en la cantidad de proteínas del día 4 al 9, sin embargo la cantidad de proteínas disminuyó del día 9 al 14 y se incrementó del día 14 al 18. Para el experimento VI la disminución de proteínas se mantuvo desde el día 4 hasta el 14, sin embargo aumentó al término de la cinética. Para el caso del experimento VII el incremento se mantuvo constante durante toda la cinética. En los experimentos VIII y IX se muestra un incremento al día 9, en días posteriores se observa una disminución en la concentración de proteínas.

Los resultados del diseño se analizaron mediante análisis estadístico, en la Figura 8 se observa el efecto del N en la concentración de proteínas solubles de *S. acutus*.

Los resultados del diseño se analizaron mediante análisis estadístico, en la Figura 8 se observa el efecto del nitrógeno en la concentración de proteínas solubles de *S. acutus*.

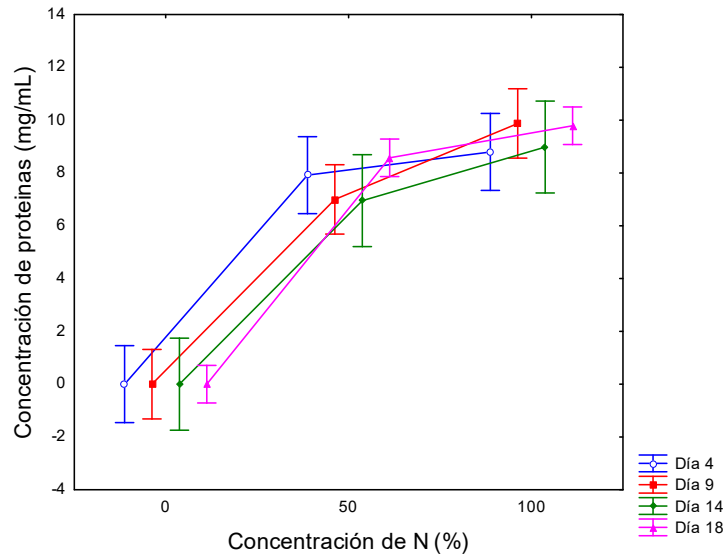


Figura 8. Efecto de la concentración de N en la producción de proteínas de *S. acutus* ($p < 0.05$)

Se observa en los resultados (Fig. 8) el efecto del N sobre la producción de proteínas solubles. En ausencia de N (0 %) la generación de proteínas solubles es nula, esto es debido a que el nitrógeno es un elemento clave para la síntesis proteica. De acuerdo con Cai y col., (2013) y Procházková y col., (2014) el N es esencial para muchos de los componentes funcionales de las algas incluidas proteínas estructurales y enzimas, ácidos nucleicos, clorofila y moléculas de transporte de energía, por otro lado, en concentraciones de 50 % y 100 % de N no se presenta una diferencia significativa ($P > 0.05$). Por lo cual el macronutriente más importante en el desarrollo celular así como en la síntesis de proteínas es el N.

En la Figura 9 se indica el efecto del P en la generación de proteínas solubles en *S. acutus*.

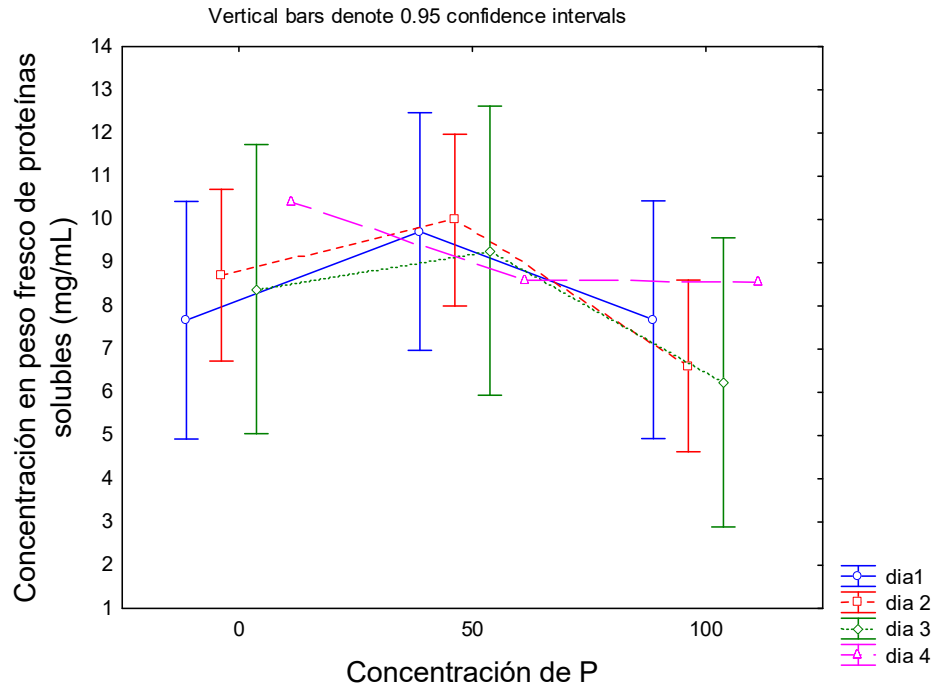


Figura 9. Efecto de la concentración de P en la generación de proteínas solubles de *S. acutus*

Como se observa en la Figura 9, la concentración de P (0, 50 y 100 %) no presenta diferencias significativas ($P > 0.05$) por lo que se puede aseverar que el P no afecta la síntesis de proteínas solubles en *S. acutus* en el rango estudiado. El fósforo está relacionado mayormente con la generación de fosfolípidos, así mismo es fundamental para el ciclo de energía de las microalgas (Cai y col., 2013; Procházková y col., 2014).

En la Figura 10 se presentan los efectos de la concentración de NaCl (0, 50, 100 %) en la producción de proteínas en *S. acutus*.

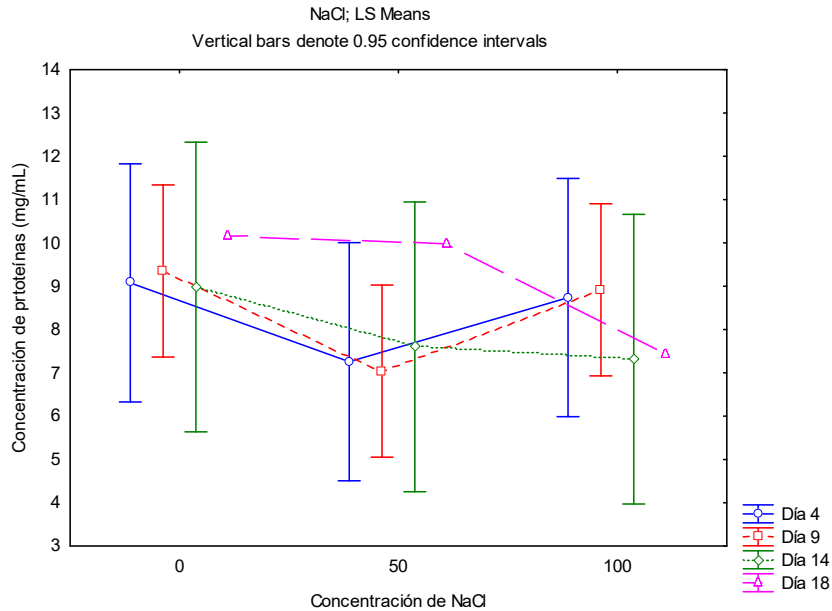


Figura 10. Efecto de la concentración de NaCl en la síntesis de proteínas de *Scenedesmus acutus*

El efecto que presenta la concentración de NaCl (Figura 10) no es significativo ($P > 0.05$) en el rango estudiado para la síntesis proteica. El NaCl mantiene la presión osmótica y el equilibrio iónico de la célula (Fernández, 2014);

4.5 Cuantificación de clorofila A en *Scenedesmus acutus*

La clorofila es fundamental para los procesos fotosintéticos de la microalga ya que es el pigmento encargado de la generación de electrones que se utilizarán más tarde para los procesos de fijación del carbono. La clorofila A puede utilizarse como medida directa de la cantidad de biomasa producida en un cultivo (Chang y col., 2015; Arnoud y col., 2014). Para este estudio, la cuantificación de clorofila A solo fue posible realizarla en los experimentos IV, V, VI, VII, VIII y IX dado que los experimentos I, II y III no presentaron acumulación significativa de biomasa. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un ANOVA. La Figura 11 muestra los resultados de la cuantificación de clorofila A en los días 4, 9, 14 y 18 de la cinética de crecimiento.

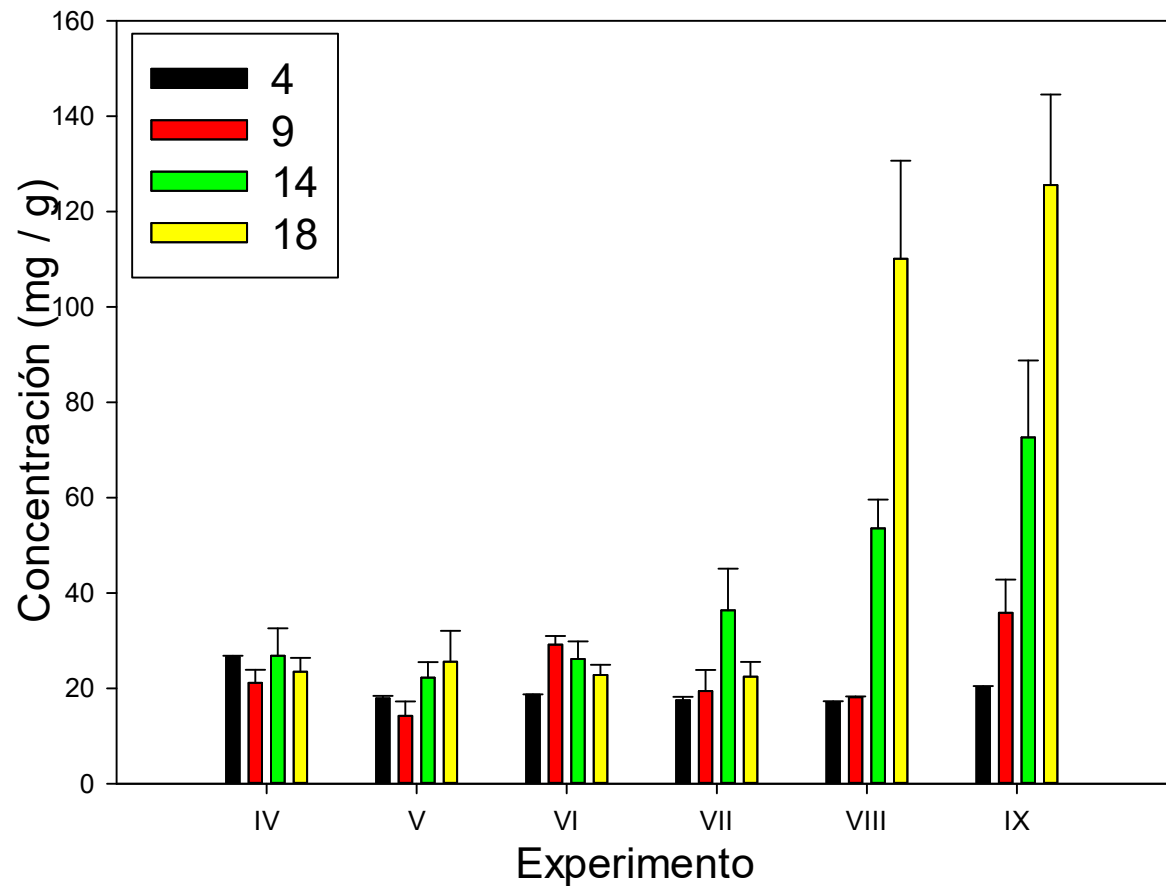


Figura 11. Cuantificación de clorofila a en los días 4, 9, 14 y 18 de la cinética de crecimiento de *S. acutus*

La cantidad de clorofila varía de acuerdo al día en el que se encontraba en la cinética de crecimiento, como se observa en la figura 11 la cantidad de clorofila en el día 4 para cada prueba no muestra un aumento significativo ($P > 0.05$), esto se debe a que en esta etapa *S. acutus* está en periodo de adaptación y su crecimiento aun no es significativo. Los experimentos VIII y IX (control) presentaron una mayor cantidad de clorofila a, esto se debe a que en ambos casos la cantidad de N es del 100 % y como se observó una concentración elevada de este nutriente influye en un mayor crecimiento de *S. acutus*, la cuantificación de clorofila en los experimentos V, VI y VII al compararlos con el experimento VIII y el control (IX) se observa que existe una diferencia significativa

($P < 0.05$) en la cantidad de contenido, esto se debe a que en estos experimentos la concentración de N es del 50% lo que disminuye el crecimiento de *S. acutus*, para el experimento VII la concentración de N es del 100 %, sin embargo, el contenido de clorofila es significativamente menor al comparar con el control (IX) y el experimento VIII, esto se debe a que el contenido de P limita el crecimiento celular y la síntesis de proteínas para fotosíntesis, en esta prueba la concentración de P es del 0 %.

Se realizó un análisis estadístico comparando las diferentes concentraciones de N, P y NaCl en la síntesis de clorofila a en los medios de cultivo los resultados se aprecian en la Figura 12

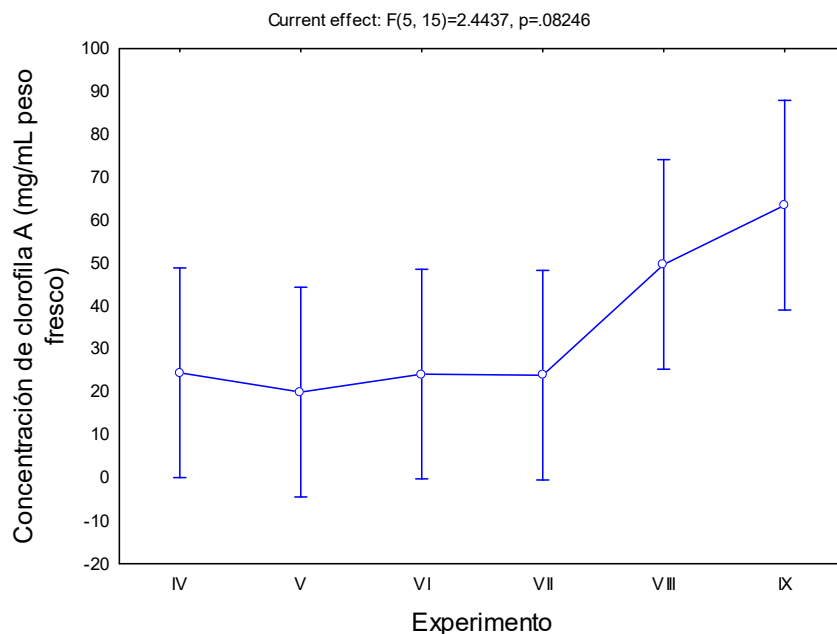


Figura 12. Análisis de clorofila a en distintas concentraciones de N, P y NaCl (experimentos IV, V, VI, VII, VIII, IX) en *S. acutus*

En los experimentos IV, V, VI y VII la cantidad de clorofila permanece en valores menores a 30 mg/g en peso fresco siendo estadísticamente iguales mientras que para el VIII y IX los valores se incrementan a más de 40 mg/g en peso fresco. Esto puede deberse al efecto que tiene el P ya que la limitación se da

en la tasa de síntesis y regeneración de sustratos en el ciclo de Calvin-Benson, reduciendo así la tasa de utilización de luz para fijación de carbono. Las células pueden sufrir también un decremento en los fosfolípidos de membrana. Por otra parte la eficiencia del fotosistema II (PSII) disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida en el lecho pigmentario, derivando en una reducción de la tasa de fotosíntesis, lo cual a su vez lleva a una reducción en la tasa de respiración (Barsanti y Gualtieri, 2006).

4.6 Cuantificación de biomasa total en *Scenedesmus acutus*

La acumulación de biomasa se presenta cuando la célula dispone de los nutrientes necesarios. En el caso del N, un incremento en la disponibilidad generalmente deriva en un incremento de la abundancia de productores primarios (Camargo, 2006), además el N es una parte fundamental de los aminoácidos, nucleótidos y clorofila. Con esto en mente se cuantificó el total de la biomasa en peso seco resultante de la cinética de crecimiento de *S. acutus*, en la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de biomasa en peso seco.

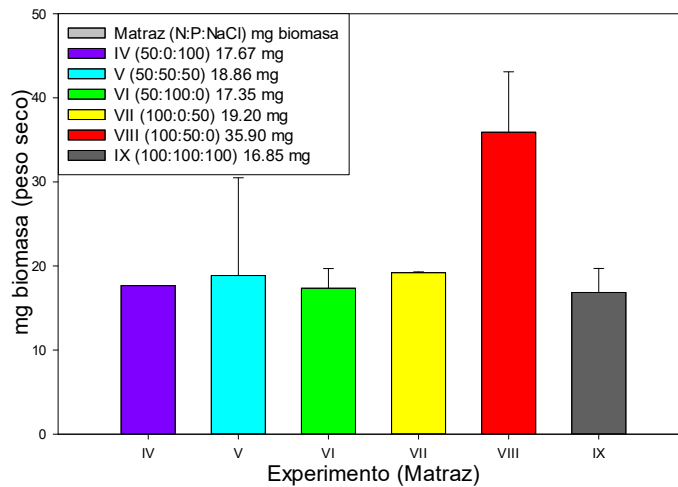


Figura 13. Cuantificación de biomasa total (en peso seco) en *S. acutus* en distintas concentraciones de N, P y NaCl (experimentos IV, V, VI, VII, VIII, IX).

Los resultados de la Figura 13 indican que el experimento VIII acumuló una cantidad significativamente mayor de biomasa total, esto puede deberse a que la concentración de N es del 100 % y no presenta estrés ocasionado por la concentración de NaCl (0 %), por otro lado el experimento IX no muestra diferencias significativas ($P>.05$) con respecto a los demás experimentos (IV, V, VI y VII).

En la Figura 14 se observan los efectos de la concentración de N en la producción de biomasa en *S. acutus*.

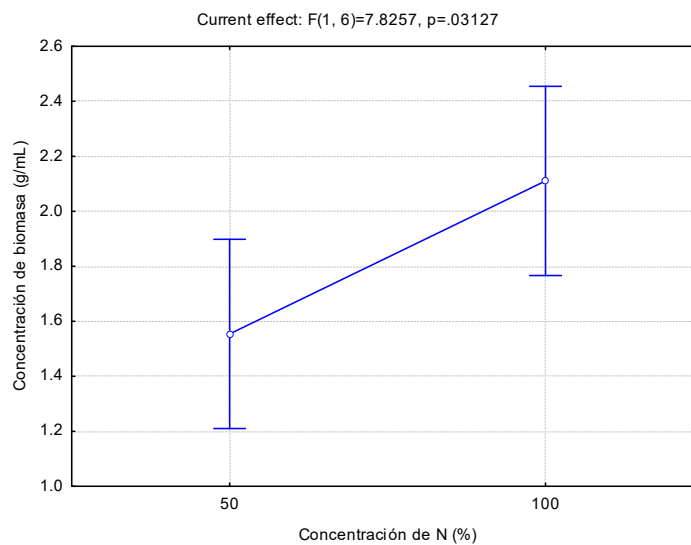


Figura 14. Efecto de la concentración de N (50%, 100%) para la generación de biomasa en *S. acutus*

Como se muestra en la Figura 14, no existe un efecto significativo ($P>0.05$) en la generación de biomasa que se da con el incremento de la concentración de nitrógeno (50-100%). De acuerdo con lo reportado por Cai y col. (2013) y Procházková y col. (2014), el N es esencial para una gran cantidad de componentes funcionales de las microalgas; incluidas proteínas estructurales y enzimas, ácidos nucleicos, clorofila y moléculas de transporte de energía.

En la Figura 15 se aprecia el efecto que tiene la concentración de P (0, 50 y 100 %) en la acumulación de biomasa de *S. acutus*.

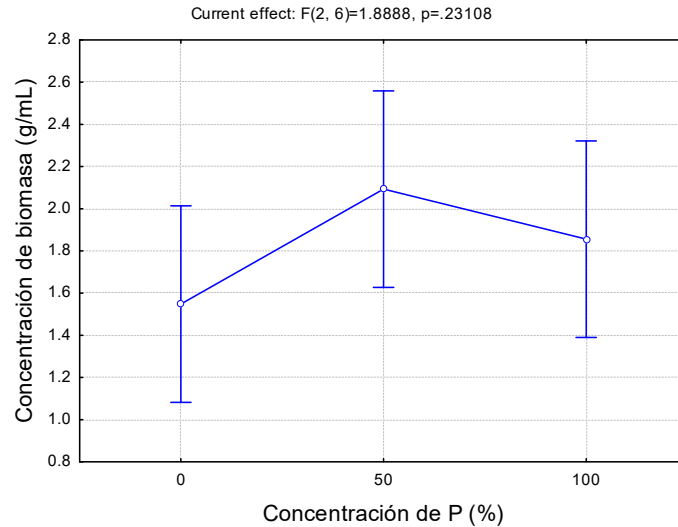


Figura 15. Efecto de la concentración de P (0, 50, 100 %) para la generación de biomasa en *S. acutus*

Como se observa en la Figura 15 no existe un efecto significativo ($P > 0.05$) de la concentración de P en la generación de biomasa, a pesar de que el P se utiliza en algas para una serie de componentes incluidos como fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, además de que es fundamental para el ciclo de energía de las microalgas (Cai y col., 2013; Procházková y col., 2014) sin embargo el efecto nulo presentado por el P puede ser atribuido a que existe un fenómeno común de absorción de P adicional, más allá de lo requerido para el crecimiento celular, almacenado en forma de polifosfato; conocido como captación de lujo (Powell y col., 2009) lo que pudo ocasionar que la célula no necesitara de concentraciones de P elevadas para la producción de biomasa.

Por otro lado la generación de biomasa también puede ser afectada por las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. En la figura 16 se aprecia el efecto de la concentración de NaCl en la generación de biomasa en *S. acutus*.

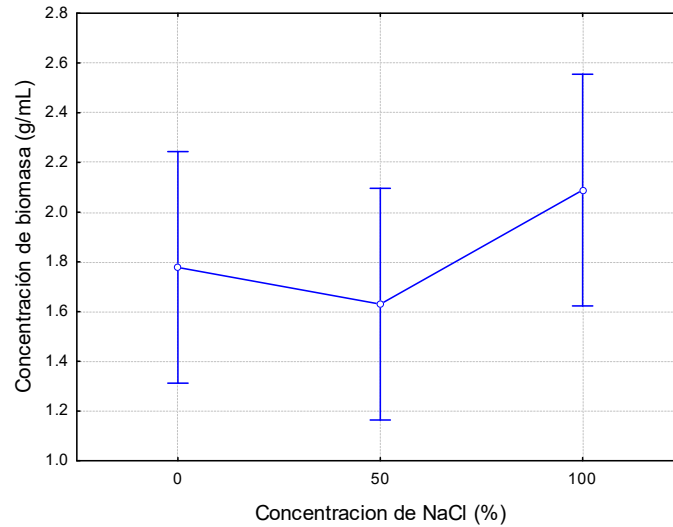


Figura 16. Efecto de la concentración de NaCl (0%, 50%, 100%) para la generación de biomasa en *S. acutus*

Como se observa en la Figura 16 no se presenta un efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) de la concentración de NaCl en la generación de biomasa, esto puede deberse a que el NaCl funciona como regulador de la presión osmótica y el equilibrio iónico (Fernández, 2014), por lo que la falta de un efecto significativo puede ser debido a que *S. acutus* presenta tolerancia a las concentraciones de NaCl evaluadas en este trabajo.

4.7 Cuantificación de lípidos totales y perfil de ácidos grasos de *S. acutus*

La producción lipídica puede ser desencadenada por condiciones de estrés en la células de microalgas (BenMoussa y col., 2016), por lo que posterior a la cuantificación de biomasa, se realizó la extracción y cuantificación de lípidos totales, los resultados se muestran en la Figura 17.

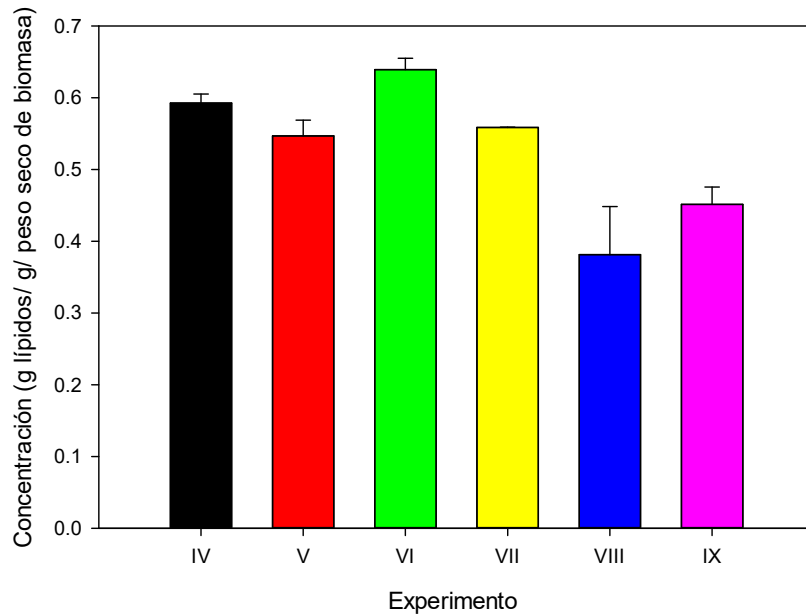


Figura 17. Concentración de lípidos totales en las diferentes condiciones experimentales

Como se muestra en la Figura 17, la mayor concentración de lípidos se presentó en los experimentos IV y VI caracterizados por contener 50% de N, mientras que la menor concentración se muestra en el experimento VIII y IX que fueron los que contenían concentraciones de 100% de nitrógeno. Los efectos de los nutrientes (N, P y NaCl) fueron analizados mediante una ANOVA. En la Figura 18 se presenta el efecto del N sobre la síntesis de lípidos en *S. acutus*.

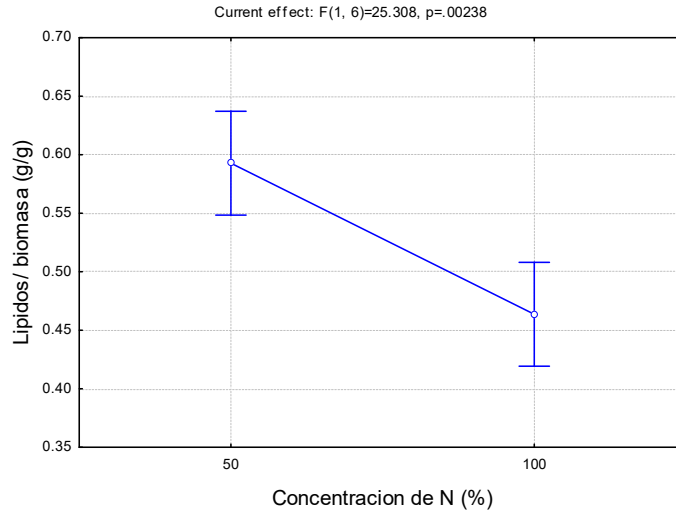


Figura 18. Efecto de la concentración de N (50%, 100%) para la generación de lípidos en *S. acutus*

En la Figura 18 se aprecia un efecto significativo ($P < 0.05$) en la producción de lípidos en *S. acutus*. De acuerdo a Li y col. (2010) cuando la concentración de nitrógeno es baja, la célula canaliza un mayor flujo metabólico generado por la fotosíntesis hacia la biosíntesis de lípidos, lo cual explica por qué en la deficiencia de nitrógeno existe una mayor acumulación lipídica.

En la Figura 19 se indica el efecto de la concentración de P en la acumulación de lípidos en *S. acutus*.

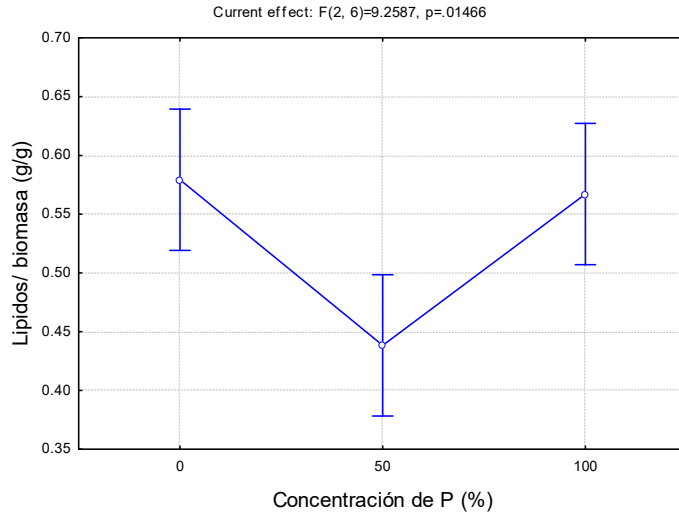


Figura 19. Efecto de la concentración de P en la biosíntesis lipídica de *S. acutus*.

El efecto producido por la concentración de P (Fig. 19). En ausencia de P (0%) se observa un incremento en la producción de lípidos, el cual es atribuido al estrés ocasionado por la falta de este nutriente; mientras que en concentraciones de 50%, la microalga baja su actividad de biosíntesis de lípidos por lo cual infiere que la célula no se encuentra en estado de estrés, sin embargo en concentraciones de 100% la biosíntesis de lípidos vuelve a incrementarse. De acuerdo con lo reportado por Wu y col. (2012) el efecto anterior puede deberse a que la absorción de fósforo en ausencia de crecimiento sin inanición previa puede ser causado por la "captación de lujo".

En la Figura 20 se indica el efecto de la concentración de NaCl en la biosíntesis lipídica en *S. acutus*.

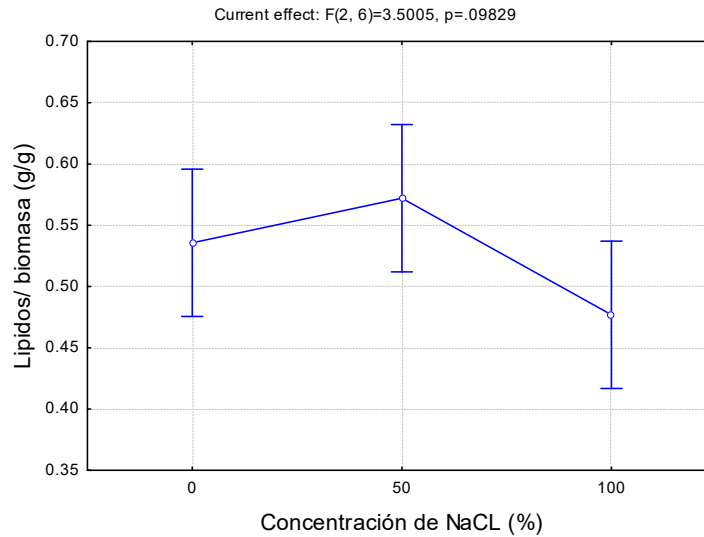


Figura 20 Efecto de la concentración de NaCl (0, 50 y 100%) en la biosíntesis de lípidos de *Scenedesmus acutus*

En la figura anterior (Figura 20) no se muestra efecto significativo ($P > 0.05$) de la concentración de NaCl en la biosíntesis lipídica de *S. acutus*. A pesar de que el NaCl puede ocasionar estrés salino y un incremento en el contenido lipídico, las concentraciones probadas en este estudio pudieron no ser suficientes para que presentara resultados significativos.

4.7.1 Perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus acutus*

. En la figura 21 se muestran los resultados de los lípidos derivatizados previos al análisis de cromatografía de gases (GC), en donde se puede observar una separación entre la fase orgánica y la fase acuosa. Los pigmentos fueron removidos previo al análisis de la fracción grasa por GC. Los ácidos grasos detectados fueron agrupados por su nivel de saturación-insaturación.



Figura 21. Lípidos derivatizados de los experimentos IV, V, VI, VII, VIII y IX

Los resultados del perfil de ácidos grasos se muestran a continuación (Fig. 22).

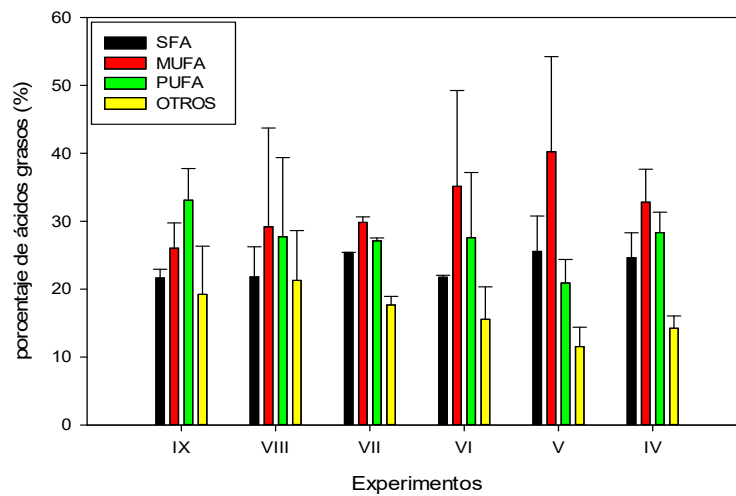


Figura 22. Porcentaje de ácidos grasos (SFA, MUFA, PUFA y otros) presentes en *S. acutus* bajo las diferentes condiciones experimentales.

La cantidad de ácidos grasos saturados (SFA) se presentan en porcentajes mayores al 20% para todas las condiciones experimentales, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se presentan hasta en un 40% en los experimentos V (N 50%, P50%, NaCl 50%) y VI (N 50%, P 100%, NaCl 0%), mientras que para las demás condiciones (IV, VII, VIII y IX) la cantidad de ácidos grasos no llegó a ser

mayor del 30%. Por otra parte los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) se presentan en todos los casos con porcentajes mayores al 20% siendo el experimento IX el que presentó porcentajes mayores al 30%, los ácidos grasos no identificados (OTROS) fueron del 10 al 20% en todos los casos.

El perfil de ácidos grasos para los experimentos IV al IX se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de ácidos grasos presentes en *Scenedesmus acutus* bajo concentraciones de N, P, NaCl (0, 50 y 100%)

Ácido graso	Experimento					
	IV	V	VI	VII	VIII	IX
C8:0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C9:0	NR	NR	NR	0.36	NR	NR
C10:0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C12:0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C14:0	1.11 ± 0.00	0.61	1.133	0.99	0.89	NR
C16:0	20.54 ± 3.3	20.81 ± 4.04	18.37 ± 0.45	21.44 ± 1.47	18.95 ± 3.79	18.43 ± 1.39
C16:1	2.99 ± 1.61	3.18 ± 1.78	3.20 ± 1.44	2.21 ± 0.94	3.98 ± 1.29	3.05 ± 0.65
C17:0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C18:0	3.16 ± 0.09	4.42 ± 1.60	2.8 ± 0.64	3.26 ± 0.53	2.39 ± 0.0	3.21 ± 0.11
C18:1	17.88 ± 12.84	23.74 ± 19.94	28.71 ± 12.4	25.38 ± 0.05	21.22 ± 12.28	13.28 ± 3.5
C18:2	11.67 ± 2.18	10.62 ± 1.52	10.50 ± 0.77	11.04 ± 2.02	8.71 ± 2.19	9.14 ± 0.71
C18:3	16.65 ± 0.82	10.28 ± 1.93	17.06 ± 8.83	16.07 ± 1.59	19.00 ± 9.44	23.95 ± 3.94
Σ SFA	24.62 ± 3.39	25.55 ± 5.21	21.74 ± 0.29	25.39 ± 0.02	21.79 ± 4.43	21.64 ± 1.27
Σ MUFA	32.80 ± 4.85	40.22 ± 14.00	35.13 ± 14.1	29.82 ± 0.81	29.19 ± 14.52	26.02 ± 3.71
Σ PUFA	28.33 ± 12.41	20.90 ± 3.46	27.56 ± 9.61	27.11 ± 0.43	27.72 ± 11.64	33.09 ± 4.66
Σ Otros	14.23 ± 1.82	11.55 ± 2.82	15.55 ± 4.7	17.66 ± 1.27	21.29 ± 7.32	19.23 ± 7.09

Como bien se observa en la tabla 5, los ácidos grasos presentes (excepto el Mirístico con porcentajes menores al 1.13%) fueron de una longitud mayor a 16 carbonos, por lo que los lípidos formados son considerados ideales para la generación de biodiesel y, ya que la generación de este pretende sustituir al diesel (C16-C22), se puede aseverar que los lípidos extraídos de *Scenedesmus acutus*

pueden llegar a ser usados con este propósito por lo que la mejor condición que se observa para la síntesis lipídica y la producción de biodiesel es la VIII (100% N) que también observó la mayor cantidad de biomasa, la cual compensa la cantidad de lípidos sintetizados por *S. acutus*

CONCLUSIONES

Los resultados generados en este proyecto permiten generar las siguientes conclusiones:

- La mayor cantidad de biomasa se presenta en el experimento VIII (N 100 %, P 50 % y NaCl 0 %) mientras que la mayor cantidad de lípidos la contenía el experimento VI (N 50%, P 100%, NaCl 0%).
- Un porcentaje menor a 50% de Nitrógeno respecto a la concentración inicial en el medio Bold imita el crecimiento de *S. acutus*.
- El experimento VIII (N 100 %, P 50 % y NaCl 0 %) permite obtener un aumento significativo en el contenido de clorofila para *S. acutus* y presenta una mayor acumulación de ácidos grasos.
- La cantidad de ácidos grasos saturados (SFA) es mayor al 20% en todas las condiciones experimentales analizadas.
- La cantidad de ácidos grasos identificados presentan una longitud mayor a 16 carbonos, por lo que pueden considerarse apropiados para la generación de biodiesel.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad N., Majeed T. (2007) An overview of biomass energy utilization in Pakistan. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 12:1988–96.

Arias M., Martínez A., Cañizares R. (2013) Biodiesel production from microalgae: cultivation parameters that affect lipid production, *Acta Biológica Colombiana*, 1:18-45.

Arnon DI. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24:1–15.

Azad A., Khan M., Ahasan T., Ahmed S. (2014) Energy scenario: production, consumption and prospect of renewable energy in Australia. *Journal of Power and Energy Engineering*, 2:19–25.

Banković-Ilić I., Stamenković O., Veljković V. (2012) Biodiesel production from nonedible plant oils. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 16:3621–47.

Bashan L., Bashan Moreno Y., Lebsky M., Bustillos J. (2002) Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48:514–21.

Bashan L., Antoun H., Bashan Y. (2005) Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology*, 54:197–203.

Ben Moussa-Dahmen., Chtourou I., Rezgui H., Sayadi F., Dhouib S. (2016) Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in *Amphora subtropica* and *Dunaliella sp.* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 218, 816–825.

Bischoff H., Bold H. (1993) Phycological studies. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *University of Texas Publications*, 6318:1–95.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 14:557–77.

Cai T., Park S., Li Y. (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19:360–369.

Camargo A., Alonso A. (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environmental International*, 32: 831-849.

Carl Sa., Bachar Z., Othmane M., Pierre-Yves P., Garcia C. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35:265–278.

Chang J., Leung D., Wu C., Yuan Z. (2003) A review on the energy production, consumption, and prospect of renewable energy in China. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 7:453–68.

Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294–306.

Connolly B., Mathiesen I., Ridjan A. (2014) A comparison between renewable transport fuels that can supplement or replace biofuels in a 100% renewable energy system. *Energy*, 73:110-125

Correa S., Arbilla G. (2008) Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmospheric Environment*, 42:769–75.

Degen J., Uebele A., Retze A., Schmid U., Trosch W. (2001) A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*, 92:89–94.

Demirbas A. (2005) Biodiesel production from vegetable oil by supercritical methanol. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64:858–65.

Demirbas A. (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50:14–34.

González L. (2010) influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, *Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Departamento De Biología*.

Gonzalez L., Bashan Y. (2000) Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the

plantgrowth- promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1527–31

Heredia T., Wei W., Ruan R., Hu B. (2011) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioenergy*, 35:2245–2253.

Imran P., Kaumeel C., Rahulkumar M., Khanjan T., Shailesh K., Patidar A., Sandhya M. (2015) Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 189:341–348.

Kojima E., Zhang K. (1999) Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. *Photobiological hydrogen production*, 87:811–5

Kumar N., Varun S. (2013) Performance and emission characteristics of biodiesel from different origins: a review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 21:633–58.

Lee Y. (2001) Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13:307–15.

Lebsky V., Gonzalez L., Bashan Y. (2001) Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:1–8.

Liu Z., Wang G., Zhou B. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology*. 99:4717–4722.

Li Y., Han D., Hu G., Sommerfeld M., Hu, Q. (2010) Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 107 (2): 258-268.

Liang Y., Sarkany N., Cui Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31:1043–9.

Martínez F., Ascaso C., Orús M. (1991) Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Annals of Botany*, 67: 239–45.

Mata M., Martins A., Caetano S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 14:217–32.

Metz B., Davidson O., Bosch P., Dave R., Meyer L. (2007) Fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate changes. *UK and New York, USA: Cambridge University Press*.

Mohamed P., Ramesh K. (2017) Green technology and performance consequences of an eco-friendly substance on a 4-stroke diesel engine at standard injection timing and compression ratio. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 31(3):1497–507.

Mohan S., Devi M. (2014) Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource Technology*, 165:288–294.

Molina E., Belarbi E., Fernández F., Robles A., Chisti Y. (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20:491–515.

Munoz R., Guieysse B. (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, 40:2799–815.

Nabi M., Rahman M., Akhter M. (2009) Biodiesel from cotton seed oil and its effect on engine performance and exhaust emissions. *Applied Thermal Engineering*, 29:2265–70.

Naim R., Muhammad S., Madeha S., Tariq M., Jong-In H. (2014) Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40:760–778.

No S. (2011) Inedible vegetable oils and their derivatives for alternative diesel fuels in CI engines: a review. , *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15:131–49.

Ogawa T., Aiba S. (1981) Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23:1121–32.

Pérez B., Toledano T., Garduño G., Escobedo R. (2015) Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production, *Algal Research*, 7:33–44.

Popovich C., Damiani D., Constenla A., Martínez H., Freije M., Giovanardi S., Pancaldi I. (2012) *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource Technology*, 114:287–293.

Powell N., Shilton A., Chisti Y., Pratt S. (2009) Towards a luxury uptake process via microalgae - defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, 43:4207–4213.

Pradhan C. (2014) Development of biofuels in South Africa: Challenges and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39:1089–1100.

Procházková G., Brányiková I., Zachleder V., Brányik T. (2014) Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26:1359–1377.

Qiang H., Richmond A. (1996) Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 8:139–45.

Raja A., Sarvanan B., Sitharthaseelan J., Sudhkar S., Sarvanan G. (2003) Fumigation of methanol in diesel engine through recovering waste heat from exhaust gas with fuel additives. *Journal of The Institution of Engineers*, 83:153–7.

Ramadhas A., Jayaraj S., Muraleedharan C. (2006) Theoretical modeling and experimental studies on biodiesel-fueled engine. *Renewable Energy*, 31:1813–26.

Saladini F., Patrizi N., Pulselli F., Marchettini N., Bastianoni S. (2016) Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66:221–227.

Sanz E., Chamizo A., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science*, 6 (10).

Senthikumar G., Gunasekaran P. (2005) Bioethanol production from cellulosic substance: engineered bacteria and process integration challenge. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64:845–53.

Sheehan J., Combreco V., Duffield J., Garboski M., Shapouri H. (1998) An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycle. A report by US department of Agriculture and Energy. Golden, CO, US: National Renewable Energy laboratory.

Solovchenko A., Verschoor N., Jablonowski L. (2016) Phosphorus from wastewater to crops: an alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances*, 34 (5):550–564.

Verma P., Sharma M., Dwivedi G. Impact of alcohol on biodiesel production and properties. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 56:319–33.

Wang S., Zhu J., Dai L., Zhao X., Liu D., Du W. (2016) A novel process on lipid extraction from microalgae for biodiesel production. *Energy*, 115:963-968.

Wu Y., Yu Y., Li X., Hu H., Su Z. (2012) Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*, 112:193–198

Yeh K., Chang J. (2012) Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105:120–7.

Zhang K., Miyachi S., Kurano N. (2001) Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:428–33.