



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
ENERGÍA-FUENTES RENOVABLES

CULTIVO MICROALGAL Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS DE ALTO VALOR BAJO EL CONCEPTO DE
BIORREFINERÍA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

I. A. DULCE MARÍA RUIZ GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ADRIANA MARGARITA LONGORIA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE ENERGÍAS RENOVABLES, UNAM

TEMIXCO, MORELOS. ENERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Pathiyamattom Joseph Sebastian

Secretario: Dra. Villafán Vidales Heidi Isabel

1^{er.} vocal: Dra. Longoria Hernández Adriana M.

2^{do.} vocal: Dr. Martínez Jiménez Alfredo

3^{er.} vocal: Dr. Castro Galiano Eulogio

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Instituto de Energías Renovables, UNAM
Temixco, Morelos.

Instituto de Biotecnología y Agroindustrias, Universidad Nacional de Colombia
Manizales, Caldas.

TUTOR DE TESIS

DRA. ADRIANA MARGARITA LONGORIA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE ENERGÍAS RENOVABLES, UNAM

FIRMA

Contenido

Lista de Figuras	v
Lista de Tablas	VII
Agradecimientos	XI
1. Introducción	1
1.0.1. Objetivo general	2
1.0.2. Objetivos específicos	2
2. Antecedentes	3
2.1. Introducción	3
2.2. Bioeconomía	4
2.3. Concepto de biorrefinería	5
2.4. Microalgas	6
2.5. Aplicaciones industriales de las microalgas	7
2.5.1. Alimentación humana	7
2.5.2. Alimentación animal	7
2.5.3. Cosmética	8
2.5.4. Pigmentos	8
2.5.5. Biofertilizantes	8
2.5.6. Biocombustibles	8
3. Cultivo de microalgas	11
3.1. Introducción	11
3.1.1. Sistemas abiertos	11
3.1.2. Sistemas cerrados (Fotobiorreactores)	12
3.2. Factores de crecimiento	13
3.2.1. Nutrientes	14
3.2.2. Agitación	14
3.2.3. Temperatura	15
3.2.4. Salinidad	15
3.2.5. pH	15

3.2.6. Iluminación	16
3.3. Metodología	17
3.3.1. Microalgas	17
3.3.2. Medio de cultivo	17
3.4. Sistema de cultivo	18
3.4.1. Fotobiorreactor	18
3.4.2. Cabina de cultivo	19
3.4.3. Preparación de inóculo	21
3.4.4. Cultivo de 144 L	23
3.5. Medición del crecimiento	24
3.5.1. Conteo celular	24
3.5.2. Densidad óptica	25
3.6. Determinación de pigmentos	26
3.7. Consumo de nutrientes	27
3.7.1. Determinación de Nitrato	27
3.7.2. Determinación de Nitrito	27
3.7.3. Determinación de Nitrógeno amoniacal	28
3.7.4. Determinación de Fosfato	28
3.8. Cosecha y secado	29
3.9. Resultados y discusión	30
3.9.1. Seguimiento de crecimiento celular	30
3.9.2. Concentración de pigmentos	33
3.9.3. Consumo de nutrientes	35
4. Biorrefinería: Obtención de metabolitos de alto valor	39
4.1. Biorrefinerías de microalgas	39
4.2. Microalgas y carotenoides	39
4.2.1. Aplicaciones de los carotenoides	44
4.3. Métodos de extracción de carotenoides	45
4.3.1. Convencionales	45
4.3.2. No convencionales	45
4.4. Extracción de metabolitos de alto valor	50
4.4.1. Preparación de la biomasa	50
4.4.2. Extracción de carotenoides	50
4.5. Análisis de los extractos	52
4.6. Resultados y discusión	53
5. Conclusiones y Perspectivas	57
5.0.1. Conclusiones	57
5.0.2. Perspectivas	58
Referencias	59

Anexo I

73

Anexo II

77

Lista de Figuras

3.1.	Fotografía del cultivo mixto de microalgas visto a 40X.	17
3.2.	Representación esquemática del diseño de los fotobiorreactores.	19
3.3.	Representación esquemática del diseño de la cabina de crecimiento con fotoperiodos.	20
3.4.	Inóculo 1 L.	21
3.5.	Diagrama de instalación y componentes del fotobiorreactor.	22
3.6.	Sistema de cultivo del inóculo de 15 L.	23
3.7.	Cultivo en la cabina de cultivo con fotoperiodos.	24
3.8.	Muestra de cultivo observada con el objetivo 10X.	25
3.9.	Muestra tomada al día ocho de cultivo.	26
3.10.	Extracción de pigmentos con metanol.	27
3.11.	Cosecha y centrifugación del cultivo.	29
3.12.	Biomasa obtenida.	29
3.13.	Dinámica de crecimiento en microalgas.	30
3.14.	Crecimiento celular	31
3.15.	Crecimiento del cultivo. Concentración celular en Cel mL ⁻¹ (línea color verde) cada punto representa el promedio de cuatro réplicas y su respectiva barra de error. Suma progresiva de duplicaciones celulares (línea color anaranjado).	31
3.16.	Correlación de la concentración celular contra la densidad óptica a 750 nm.	32
3.17.	Concentración de pigmentos del día 0 a 14 de cultivo. Concentración de clorofila a (barras color verde). Concentración de carotenoides (barras color anaranjado).	33
3.18.	Variación de la concentración de P ₄ ³⁻	35
3.19.	Variaciones de las concentraciones de a) nitrato, b) nitrógeno amoniacal y c) nitrito durante el crecimiento celular. Cada punto en las curvas representa el promedio de cuatro réplicas y su respectiva barra de error.	36
4.1.	Estructuras moleculares de los carotenoides a) Carotenos (β -caroteno), b) Xantófilas (Luteína). Adaptado de: Jin et al. (2013 [90]).	40
4.2.	Contenido de carotenoides en diferentes fuentes naturales. Adaptado de: Mulders et al. (2014) [34].	41

4.3.	Diagrama de fases sólido/líquido/gas PT: punto triple, PC: punto crítico, Pc: presión crítica, Tc: temperatura crítica Tomada de: Mendiola et al. (2008) [118].	47
4.4.	Esquema de un extractor de fluidos supercríticos. Elaboración propia con información de: Reglero et al. (2004) [124].	48
4.5.	Reducción de tamaño de las hojuelas de biomasa microalgal.	50
4.6.	Equipo de extracción supercrítica.	51
4.7.	Esquema del equipo de extracción supercrítica.	51
4.8.	Muestra empleada para la extracción con SFE.	52
4.9.	Rendimiento de extracción de β -caroteno con CO ₂ supercrítico y etanol.	53
4.10.	Rendimiento global de extracción de β -caroteno con CO ₂ supercrítico y etanol.	54
4.11.	Biomasa microalgal antes y después del proceso de extracción a las condiciones de presión y temperatura propuestas.	55
1.	Planos del fotobiorreactor de placa plana.	74
2.	Planos cabina de cultivo con fotoperiodos.	75
3.	Planos estante de tres niveles.	76
4.	Cromatograma del extracto obtenido a 200 bar y 40 °C.	77
5.	Cromatograma del extracto obtenido a 200 bar y 50 °C.	78
6.	Cromatograma del extracto obtenido a 200 bar y 60 °C.	78
7.	Cromatograma del extracto obtenido a 300 bar y 40 °C.	79
8.	Cromatograma del extracto obtenido a 300 bar y 50 °C.	79
9.	Cromatograma del extracto obtenido a 300 bar y 60 °C.	80

Lista de Tablas

3.1. Tabla comparativa entre sistemas abiertos y cerrados. Elaborada con información de [35]	13
3.2. Composición del medio de cultivo	18
4.1. Pigmentos de microalgas y su potencial aplicación [100].	42
4.2. Valores de varias propiedades fisicoquímicas de gases, líquidos y fluidos supercríticos Tomada de: Herrero et al. (2006) [111].	47
4.3. Ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción de carotenoides. . .	49

A mi madre por ser el pilar más importante y demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional. Por formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante y dar lo mejor de mí siempre.

A mi padre por su invaluable apoyo y amor que siempre me ha demostrado.

A mis segundos padres Amalia y Federico, por ser siempre mi ejemplo a seguir y por sus enseñanzas y consejos que me han ayudado a alcanzar mis metas y a cumplir mis sueños.

A Carlos López, por el amor y apoyo incondicional, por siempre darme motivos para no rendirme en momentos difíciles y hacer mis días más felices.

A mis hermanos y familia en general, por lo que representan para mí, por su apoyo incondicional siempre y por compartir conmigo buenos y no tan buenos momentos.

Agradecimientos

A mi asesora de tesis, Adriana Longoria, por ser mi guía en este proceso de aprendizaje. Gracias por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera, por motivarme a hacer cosas que enriquecieron mi trabajo y mi formación profesional y por ser además de mi asesora una amiga.

A la familia López Villalobos por todo su cariño y apoyo brindado siempre.

A mi jurado de examen a la Doctora Heidi Villafán y a los Doctores Sebastian Joseph, Alfredo Martínez y Eulogio Castro, por sus comentarios y observaciones que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

A mis compañeras y amigas del laboratorio de Bioenergía Martha Olarte y Sady García, por todo su apoyo durante el desarrollo de la etapa experimental de mi trabajo. Gracias por los momentos de distracción y pláticas entretenidas que hicieron que el estrés fuera menos.

A Mónica Burgos y a su familia por el cálido recibimiento en su país, Colombia, siempre tendré guardado eso en el corazón. A María Alejandra Castillo, Angélica y Rosarito que me hicieron sentir siempre querida y en casa. Gracias Maleja por abrirme las puertas de tu hogar, por tu amistad, por todas las pláticas y ser mi guía de turista por dos meses, gracias a tus papás también.

A los parceros del grupo de Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos del Instituto de Agroindustrias y Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, al Doctor Carlor Ariel Cardona por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, gracias por su apoyo y su amabilidad. A José Andrés González por apoyarme durante una de las etapas experimentales más importantes en mi trabajo y por todas las pláticas que hacían el trabajo más ameno.

Al Maestro José Campos y al Ingeniero José Jaime Villalobos por toda su ayuda y sugerencias que contribuyeron a mejorar el sistema de cultivo de microalgas y a Dante Meza por ayudarme a mejorar los dibujos de mi trabajo.

Al Instituto de Energías Renovables de la Universidad Nacional Autónoma de México (IER-UNAM) por darme cobijo en sus instalaciones durante mis estudios de maestría. Al

Instituto de Agroindustrias y Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, por abrirme las puertas de su institución para poder llevar a cabo una de las etapas experimentales más importantes de mi proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)- Secretaria de Energía (SENER) por el apoyo económico, con número de beca 857513, brindada para cursar mis estudios de maestría. Así mismo, agradezco a los proyectos PAPIME DGAPA-UNAM PE210918, DGAPA-PAPIIT-UNAM IN110118 y DGAPA-PAPIIT-UNAM IN109319 por el apoyo económico brindado para adquirir material y equipo utilizados en la realización del presente trabajo.

Resumen

Las microalgas tienen un gran potencial y versatilidad para la producción de biocombustibles. Sin embargo, debido a los altos costos de producción, la generación de bioenergía a gran escala a partir de microalgas aún no es rentable. Como alternativa a esto, el concepto de biorrefinería aparece como una opción dado que tiene como objetivo el aprovechamiento máximo de la biomasa a través de la obtención de múltiples productos, tales como los carotenoides que son de importancia en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Es por eso que este trabajo se centra en la obtención de biomasa microalgal para la extracción de carotenoides.

Los diferentes experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis se llevaron a cabo empleando un cultivo mixto microalgal en un sistema cerrado de fotobiorreactores de placa plana, con la finalidad de poder obtener productos de alto valor de la biomasa microalgal bajo el concepto de biorrefinería. Se llevó a cabo el seguimiento del cultivo mediante conteo celular bajo microscopio y por espectrofotometría y se evaluó el consumo de nutrientes. Después de 14 días el cultivo se cosechó por centrifugación y se secó entre 42 y 60°C durante 72 horas. La biomasa microalgal se utilizó para la extracción de carotenoides como producto de alto valor. A la vez, se estableció un sistema de cultivo que permitió la obtención de 34.5 g de biomasa seca, que representó un aumento de 9.6 veces de la producción de biomasa con respecto a la capacidad de producción del laboratorio de Bioenergía previo a la realización de éste trabajo. La extracción de carotenoides se llevó a cabo empleando CO₂ supercrítico y etanol como cosolvente. Se llevó a cabo la identificación de β -caroteno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). El mayor rendimiento de β -caroteno se registró cuando la extracción fue a 300 bar y 60 °C, obteniendo 4.42 ± 0.32 mg de β -caroteno g⁻¹ de biomasa microalgal seca. Este valor es mayor a los valores reportados para otros trabajos con monocultivos en condiciones similares de extracción (0.2 a 0.7 mg de β -caroteno g⁻¹ de biomasa microalgal seca).

Abstract

Microalgae have great potential and versatility for the production of biofuels. However, owing to high production costs, the generation of large-scale bioenergy from microalgae is not yet profitable. As an alternative to this, the concept of biorefinery emerges as an option since its principal objective is the optimum use of the biomass by obtaining several products, such as carotenoids that are of importance in the food, cosmetic and pharmaceutical industry. Therefore, this work focuses on obtaining microalgal biomass for the extraction of carotenoids and evaluate their use in biorefineries.

The different experiments performed during the development of this thesis have been carried out using a mixed microalgal culture in a closed system of flat plate photobioreactors, in order to obtain high value products of the microalgal biomass under the biorefinery concept. The culture was monitored by cell count under a microscope and by spectrophotometry, also nutrient intake was evaluated. After 14 days the culture was harvested by centrifugation and the microalgal biomass was dried between 42 and 60 °C for 72 hours. The microalgal biomass was used for the extraction of carotenoids as a high value product. At the same time, a culture system was established and allowed the obtaining of 34.5 g of dry microalgal biomass, which represented a 9.6-fold increase in biomass production with respect to the Bioenergy laboratory's production capacity prior to performing this work. Carotenoid extraction was carried out using supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. The identification of β -carotene was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). The highest yield of β -carotene was recorded when the extraction was performed at 300 bar and 60 °C, obtaining 4.42 ± 0.32 mg of β -carotene g⁻¹ of dry microalgal biomass. This value is higher than those reported for other works with monocultures under similar extraction conditions (0.2 to 0.7 mg of β -carotene g⁻¹ of dry microalgal biomass).

Capítulo 1

Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos eucariotas o procariotas con estructura unicelular o multicelular simple. Existe una variedad inmensa de estos microorganismos y pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales; encontrándose en lugares con condiciones extremas de temperatura, salinidad o pH.

Las microalgas son una fuente importante para la producción de carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y pigmentos, que son de gran importancia para la producción de alimentos, suplementos alimenticios, medicamentos, productos para el cuidado personal, fertilizantes y biocombustibles. Particularmente, la producción de biocombustibles ha generado interés por las microalgas. En la actualidad, los altos costos de inversión necesarios para el cultivo de microalgas con fines energéticos no los hace competitivos con los combustibles tradicionales. Esto ha incentivado la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento. Una de éstas es la obtención de productos de alto valor, que son utilizados en productos comerciales en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica.

Con base a lo anterior, se puede entender que el aprovechamiento integral de todas las fracciones de la biomasa microalgal abre nuevos escenarios para la obtención de biocombustibles y otros productos para que los procesos sean rentables. Esto deriva en el concepto de biorrefinería, que se refiere al proceso de conversión de la biomasa en una amplia gama de productos para alimentos, piensos, combustibles, materiales, para aplicaciones farmacéuticas, alimentarias, de salud y químicas. Es un concepto análogo a una refinería de petróleo donde es posible la obtención de diversos productos a partir de una sola materia prima para optimizar su valor.

El presente trabajo se centra en la obtención de biomasa microalgal a partir de un cultivo mixto microalgal adaptado a las condiciones ambientales locales para la extracción de carotenoides como productos de alto valor.

Primero, se llevó a cabo el cultivo mixto de microalgas en fotobiorreactores de placa plana dentro de una cabina de cultivo con fotoperiodos donde fue posible controlar la intensidad lumínica y monitorear parámetros como la temperatura y el pH. Para determinar el crecimiento celular se llevó a cabo el conteo celular en cámara Neubauer y los cambios en la

densidad óptica por espectrofotometría. Además, el seguimiento del consumo de nutrientes es otro indicativo que permite conocer la adaptación de las microalgas a las condiciones de cultivo, por lo que se llevó a cabo la medición de la concentración de nitrato, nitritos, nitrógeno amoniacal y fosfato presentes en el medio de cultivo empleado. Así mismo, se caracterizó la producción de clorofila *a* y carotenoides totales mediante espectrofotometría empleando extractos metanólicos, lo que permitió conocer el avance del cultivo en función a su producción de pigmentos y si el cultivo mixto microalgal era apropiado para la obtención de pigmentos.

Finalmente, la biomasa microalgal obtenida fue empleada para la extracción de carotenoides. Para esto, se empleó la extracción con fluidos supercríticos. Los rendimientos de extracción se estimaron de acuerdo a la caracterización de los extractos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

1.0.1. Objetivo general

Analizar la producción de carotenoides de la biomasa microalgal y llevar a cabo su extracción y caracterización.

1.0.2. Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de un cultivo mixto microalgal en fotobiorreactores de placa plana con fertilizante agrícola foliar como medio de cultivo.
- Determinar el consumo de nutrientes del cultivo mixto microalgal en fertilizante agrícola foliar como medio de cultivo.
- Extraer y cuantificar los carotenoides presentes en la biomasa microalgal.

Las secciones están organizadas de la siguiente manera: En el capítulo dos, se presenta la sección de antecedentes donde se abarcan los aspectos teóricos relacionados con el desarrollo del trabajo. En el capítulo tres, se presentan los antecedentes que describen los aspectos teóricos del cultivo de microalgas y se describe la metodología empleada en el cultivo y la medición de las características poblacionales (número de células por mililitro, los cambios en la densidad óptica, tasa de crecimiento), la concentración de clorofila *a* y carotenoides totales. También, se describe la metodología para la medición del consumo de nutrientes, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. En el capítulo cuatro, se describen los aspectos teóricos de la biorrefinería de microalgas y la metodologías para la extracción y cuantificación de los carotenoides presentes en la biomasa microalgal, además, se incluyen los resultados y la discusión. En el capítulo cinco se presentan las conclusiones y perspectivas del trabajo.

2.1. Introducción

La crisis energética mundial y el calentamiento global son dos problemas de suma importancia que afectan a la humanidad actualmente, lo anterior se debe principalmente a un mayor crecimiento demográfico, el crecimiento de la industria y una mayor dependencia hacia los combustibles fósiles. De acuerdo con la Administración de Información Energética (EIA, por sus siglas en inglés), el consumo mundial de energía ha aumentado un 44 % en las últimas dos décadas y éste podría aumentar aproximadamente a un 60 % en los próximos 20 años [1]. En México, las principales fuentes de energía son el petróleo, el gas natural y el carbón mineral, como lo muestran los datos del Banco Mundial (2015), donde se reporta que el 89.4 % de la energía empleada proviene de éstas fuentes. De acuerdo con la Secretaría de Energía (SENER), el uso de la energía en México se distribuye de la siguiente manera: 46.8 % corresponde al sector transporte, 31.7 % a la industria, 18.1 % a los sectores residencial, comercial y público y el 3.4 % al sector agropecuario [2].

La demanda de fuentes fósiles para la generación de energía y para combustibles de transporte ha provocado el agotamiento de las reservas mundiales de petróleo, que a finales de 2014 llegaron a 1,700,100 millones de barriles, capaces de cubrir la demanda de hasta 52.5 años [3], esto además provoca altas emisiones de dióxido de carbono (CO_2) al medio ambiente [4]. En 2014 las emisiones de CO_2 relacionadas a la combustión de combustibles fósiles en México fueron de 431 millones de toneladas (Mt), que corresponde a un 67.8 % más que en 1990 (257 Mt) y 9.4 % más que en 2004 (394 Mt). El sector transporte es el sector con más emisiones de CO_2 , alcanzando un 35.1 % del total [1].

Lo anterior, ha provocado un particular interés en la producción de energía a partir de fuentes renovables. Actualmente, muchos países utilizan fuentes de biomasa, desechos, energía solar, eólica, hidroeléctrica y geotérmica como alternativa a los combustibles fósiles. Los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa son combustibles considerados renovables y alternativos para la producción de energía sostenible en un futuro próximo [5].

Los biocombustibles se clasifican como de primera, segunda y tercera generación. Los

biocombustibles de primera generación provienen de cultivos como la soya, el maíz, la remolacha azucarera, la caña de azúcar, aceites vegetales y grasas animales. Esta clase de biocombustibles generan inconformidad debido a que afectan la seguridad alimentaria, los bancos mundiales de alimentos, provocan escasez de agua y deforestación. Por su parte, los biocombustibles de segunda generación, se basan principalmente en la obtención de biocombustibles a partir de semillas oleaginosas no comestibles como la *Jatropha curcas*, los residuos agroindustriales y los residuos forestales. Sin embargo, su sustentabilidad aún está en duda, debido a que compite con tierras para cultivos alimentarios [6] [7]. Actualmente, la producción de biocombustibles de segunda generación se encuentra en desarrollo para la explotación comercial de desechos como fuente de generación de biocombustibles.

Debido a las desventajas de los biocombustibles de primera y segunda generación, los biocombustibles de tercera generación han generado gran interés. La materia prima para la obtención de estos biocombustibles incluye biomasa microalgal. Alguna de las ventajas del uso de microalgas como materia prima para la obtención de biocombustibles son: pueden asimilar el CO₂ y otros nutrientes con mayor facilidad con respecto a las plantas, no compiten con tierras de cultivo, el consumo de agua es menor que la demandada por los cultivos energéticos tradicionales y se puede emplear aguas residuales para su cultivo [8] [9]. Las microalgas también son capaces de producir diferentes subproductos de alto valor como pigmentos, proteínas, vitaminas y ácidos grasos esenciales.

Los productos de alto valor son metabolitos que las microalgas pueden acumular durante su crecimiento en pequeñas cantidades, estos metabolitos suelen ser de importancia en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia y esto los hace económicamente viables para su comercialización [10]. Es posible que, debido a esto, la industria de las microalgas se desarrolle principalmente para la obtención de productos de alto valor y que secundariamente se obtengan otros productos con fines bioenergéticos [11] [12] [10].

2.2. Bioeconomía

Para abordar los desafíos sociales, como el cambio climático, la escasez de recursos naturales y el consumo insostenible de los recursos naturales, se necesita de cambios que impliquen enfoques e interacciones a largo plazo en todos los niveles de la sociedad [13]. El concepto de bioeconomía representa una oportunidad para enfrentar estos desafíos. La bioeconomía se puede definir como una economía en la que los componentes básicos para la obtención de los materiales, productos químicos y energía se derivan de los recursos biológicos renovables [14]. Está estrechamente relacionado con los sectores agrícola y forestal, así como con los recursos marinos y la gestión de residuos [13]. Este tipo de economía puede cumplir muchos de los requisitos de sostenibilidad desde un punto de vista ambiental, social y económico si es diseñada e implementada de manera adecuada [14].

Los beneficios potenciales de la transición a una bioeconomía incluyen una reducción de

las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), disminución de la dependencia de los recursos fósiles, una gestión más inteligente de los recursos naturales, una mayor seguridad alimentaria, generación de empleo en entornos urbanos y rurales [15] [14]. Además de la creación de nuevos mercados no alimentarios para la agricultura, como la bioenergía, que permitirían dar impulso al desarrollo rural. Sin embargo, si bien el potencial de la bioeconomía es impresionante, cumplir los desafíos al aumentar la escala de las actividades en paralelo al cumplimiento de los objetivos de sostenibilidad puede llegar a ser complicado [14].

Uno de los objetivos de la bioeconomía es avanzar en la reducción del uso de recursos fósiles y de ésta manera, avanzar hacia la descarbonización de la economía. El concepto de biorrefinería, es un tema central en el modelo productivo que impulsa la bioeconomía, ya que puede permitir la producción conjunta de bioenergía y bioproductos a partir de la optimización del uso de la biomasa [16].

2.3. Concepto de biorrefinería

El concepto de biorrefinería no tiene una definición única, por lo que a continuación se exponen las propuestas de diferentes autores:

- Una biorrefinería integra procesos para la conversión de la biomasa en productos químicos, biomateriales y energía con la finalidad de maximizar el valor de la materia prima y minimizar desechos y así lograr un proceso global económicamente factible [17].
- De acuerdo con la Agencia Internacional de Energía, IEA Bioenergy Task 42 “Biorefineries” [18], una biorrefinería se define como “la transformación sustentable de biomasa en energía y productos de alto valor comercializables”.
- Una biorrefinería es una instalación que integra equipamiento y procesos para la conversión eficiente de la biomasa en biocombustibles, energía y productos de alto valor. Este concepto es análogo a las refinerías de petróleo donde se producen múltiples combustibles y productos derivados [19].

Esta última definición señala el enfoque análogo al de las refinerías convencionales, en las cuales se obtienen combustibles y productos derivados a partir del fraccionamiento del petróleo. Sin embargo, existen puntos clave que contribuyen a marcar las diferencias entre ambas y los puntos potenciales de las biorrefinerías:

Integración. La transformación de la biomasa en energía se lleva a cabo en procesos separados, pero en una biorrefinería es posible integrar procesos que permitan aprovechar todas las fracciones de la biomasa para la generación de energía, biocombustibles y productos de alto valor. El desarrollo de biorrefinerías que permitan la transformación integral de la

biomasa es uno de los objetivos clave a conseguir, ya que es posible que a partir de la comercialización de los productos de alto valor se pueda obtener biocombustibles de una manera más redituable.

Versatilidad. Debido a las múltiples combinaciones que se pueden obtener al conjugar la biomasa y técnicas de conversión, la versatilidad de los procesos es algo fundamental.

Eficiencia y sostenibilidad. Una de las finalidades de las biorrefinerías es el aprovechamiento óptimo de la biomasa, para minimizar la generación de residuos y de esta manera maximizar los beneficios.

Además de los puntos ya mencionados, hay otro factor importante que también marca la diferencia entre las refinerías de petróleo y las biorrefinerías. Este factor es la materia prima, ya que en una biorrefinería se emplea biomasa derivada de materia orgánica [17].

Los productos que pueden obtenerse de una biorrefinería no solo incluyen productos similares a los obtenidos en una refinería convencional de petróleo, sino también, productos que difícilmente pueden obtenerse del petróleo, por ejemplo, productos con fines alimenticios.

2.4. Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos eucariotas o procariotas que pueden tener una estructura unicelular o multicelular simple. Entre las microalgas eucariotas se encuentran las algas verdes (*Chlorophyceae*) y las diatomeas (*Bacillariophyceae*), mientras que entre las procariotas se encuentran las cianobacterias (*Cyanophyceae*) [20].

Las microalgas pueden existir en ambientes acuáticos y terrestres, son consideradas organismos extremófilos ya que son capaces de adaptarse con facilidad a condiciones ambientales desfavorables, se localizan en todas las regiones geográficas, son responsables de la producción de 50 % de oxígeno y de la fijación del 50 % de carbono en el planeta. La biodiversidad existente de microalgas es enorme, puesto que se han podido clasificar alrededor de 40,000 especies, pero se estima que pueden existir más de 100,000 [21] [22].

En la actualidad las microalgas se han convertido en una alternativa viable para la obtención de productos bioenergéticos, como hidrógeno (H_2) mediante biofotólisis directa e indirecta; biodiesel mediante transesterificación; biogás a partir de la digestión anaerobia; bioetanol por fermentación; bio-crudo vía licuefacción hidrotermal [9]. Además de ser una fuente prometedora para la obtención de biocombustibles, las microalgas pueden ser una fuente importante para la obtención de productos de alto valor como proteínas, vitaminas, ácidos grasos esenciales y pigmentos que resultan de interés en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética [23].

Pese al interés actual del uso de microalgas como materia prima para la obtención de productos bioenergéticos, la generación de bioenergía a gran escala a partir de microalgas no es económicamente rentable y todavía no es competitiva con los combustibles a base de fuentes fósiles [10]. Por otra parte, una manera rentable para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas es el aprovechamiento máximo de la biomasa que permitan la producción simultánea de productos de alto valor y coproductos bajo el concepto de biorrefinería [24].

2.5. Aplicaciones industriales de las microalgas

Los primeros registros del uso de las microalgas datan de hace más de 2000 años en China, donde la especie *Nostoc* era utilizada como fuente de alimento en épocas de hambruna. Las microalgas han sido utilizadas desde entonces principalmente como alimento, aunque existe un gran potencial de aplicación ya que poseen una diversidad de compuestos de interés tecnológico y/o comercial. En la actualidad, existen diversas aplicaciones comerciales de las microalgas ya que se pueden emplear para mejorar el valor nutricional de los alimentos y piensos debido a su composición química; juegan un papel crucial en la acuicultura y se pueden incorporar en productos cosméticos. Además, se cultivan como fuente de materia prima para la obtención de biocombustibles y de moléculas de alto valor [25].

2.5.1. Alimentación humana

El consumo humano de microalgas esta limitado a pocas especies, esto debido a que por ser destinadas para el consumo humano se debe cumplir con controles de seguridad alimentaria. La *Spirulina* y la *Chlorella* son las especies más comercializadas actualmente y pueden encontrarse en diferentes presentaciones como tabletas, polvos y suspensiones. Los beneficios a la salud por la incorporación de microalgas a la dieta son: supresión de la hipertensión, protección contra fallas renales y la disminución de los niveles de azúcar y colesterol en la sangre, su actividad antiinflamatoria y la prevención de la formación de tumores [26] [27] [28] [29]. Además, el reciente incremento de las dietas vegetarianas y veganas han favorecido el mercado de las microalgas como fuente de alimentación humana.

2.5.2. Alimentación animal

Las microalgas pueden ser incorporadas a la alimentación de animales de granja, peces y mascotas. La acuicultura es el sector en donde las microalgas han tenido mayor explotación. Algunas especies de microalgas, tales como los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*, tienen aspectos beneficiosos para los animales, ya que contribuyen a mejorar la respuesta inmune, el control de peso, mantener una piel sana y pelo brillante. El consumo de microalgas favorece el buen desarrollo de los animales, proveyéndolos de vitaminas naturales, minerales y ácidos grasos esenciales [26] [30] [31] [29].

2.5.3. Cosmética

El extracto de ciertas especies de microalgas tales como *Arthospira* y *Chlorella* son empleadas en la industria cosmética para el cuidado del rostro y la piel en general, como cremas antiedad, productos refrescantes, regenerantes y emolientes. También se usan en cremas de protección solar y productos de cuidado del cabello. Extractos ricos en proteínas de *Arthospira* reparan los signos prematuros de envejecimiento de la piel y previenen la formación de estrías. Extractos de *C. vulgaris* estimulan la síntesis de colágeno, promoviendo la regeneración de tejidos y la reducción de arrugas [30] [25].

2.5.4. Pigmentos

Los pigmentos son esencialmente moléculas que absorben la luz del espectro visible. La longitud de onda que no es absorbida por estas moléculas es captada por el ojo humano y, por lo tanto, muestra el color correspondiente [32]. Son de gran importancia en el desarrollo de las microalgas debido a que son responsables de la absorción de luz, la fijación de CO₂, protección celular contra daños por exceso de iluminación, además de ser responsables de la coloración de éstas [33].

Las microalgas pueden producir diferentes pigmentos dependiendo de la especie y el color; las microalgas verdes producen clorofila, las rojas y azules ficobiliproteínas y las amarillas y naranjas carotenoides. Las microalgas son consideradas una fuente importante para la producción de pigmentos debido a su capacidad de sintetizar pigmentos en concentraciones mayores en comparación con las fuentes convencionales [34]. Entre las aplicaciones de estos pigmentos se puede destacar su utilización en la industria alimenticia, cosmética, nutracéutica y farmacéutica como colorantes de origen natural [35].

2.5.5. Biofertilizantes

Otra aplicación es la de biofertilizante. Las microalgas verdes-azuladas o cianobacterias son altamente utilizadas en este sector gracias a su capacidad de fijar nitrógeno, provocando un aumento en la fertilidad de los suelos, además algunas técnicas de conversión especialmente la pirólisis, producen carbón vegetal, llamado Biochar, que tiene un alto potencial para su uso en la agricultura como fertilizantes [29] [36] [37].

2.5.6. Biocombustibles

Sin duda, una de las aplicaciones más interesantes de las microalgas es la producción de biocombustibles para la obtención de energía. Los biocombustibles procedentes de esta biomasa pueden ser obtenidos mediante la utilización completa de la biomasa como el bioaceite obtenido en procesos de licuefacción hidrotermal o pirólisis o el biogás por procesos de digestión anaerobia, o a partir del uso de ciertas biomoléculas como los lípidos y azúcares para la obtención de biodiesel y bioetanol, mientras que la biomasa residual puede ser utilizada para

la producción de metano por digestión anaerobia [38] [39]. Algunas compañías como Repsol, Cepsa, British Petroleum e Iberdrola han promovido la investigación de biocombustibles a partir de microalgas como biodiesel, bioetanol o biogás como fuente de energía [35].

Capítulo 3

Cultivo de microalgas

3.1. Introducción

En una biorrefinería el cultivo de microalgas es la etapa principal, ya que permite establecer el proceso de producción de la biomasa. También, permite conocer los parámetros físicos y químicos que el microorganismo requiere para su adaptación y crecimiento.

Si bien las microalgas pueden encontrarse en muchos ambientes, con fines de investigación es necesario su cultivo en sistemas artificiales, de manera que esto permita su cultivo bajo condiciones determinadas. El cultivo de microalgas puede llevarse a cabo de dos formas: en sistemas abiertos o cerrados, cada uno de ellos presenta una serie de ventajas e inconvenientes que son presentados en la Tabla 3.1. Estos sistemas se describen a continuación.

3.1.1. Sistemas abiertos

El cultivo de microalgas en sistemas abiertos es la forma más antigua y común para el cultivo masivo de microalgas. Estos sistemas consisten principalmente en estanques abiertos poco profundos y su tamaño es de uno o varios metros. Los sistemas abiertos pueden ser naturales, circulares o del tipo raceway [40].

Circulares

Los estanques circulares son los sistemas de cultivos de microalgas a gran escala más antiguos, consisten en estanques similares a los estanques empleados para el tratamiento de aguas residuales. El diseño de estos sistemas se limita a un tamaño de aproximadamente 10,000 m² ya que es complicado tener una agitación uniforme en estanques más grandes [41] [20].

Raceway

Este sistema de cultivo consiste en un circuito cerrado de recirculación, este tipo de canales suele tener una profundidad de 0.3 m y al sistema se le acopla un agitador de paletas

para mezclar y permitir la circulación de la biomasa para evitar la sedimentación del cultivo. Son construidos en hormigón o tierra compactada. Pueden ser de diferentes longitudes y diámetros y generalmente forrados con plástico [42] [41].

La principal ventaja de estos sistemas es que son fáciles de construir y operar en comparación con un sistema cerrado. Sin embargo, presentan grandes inconvenientes como las extensiones de tierra empleada, poco aprovechamiento de la luz por parte de las células, contaminación y pérdidas de agua por evaporación, sus tasas de transferencia masiva son muy pobres dando como resultado una baja productividad de biomasa [40].

3.1.2. Sistemas cerrados (Fotobiorreactores)

Los fotobiorreactores (FBR) son sistemas cerrados para el cultivo de microalgas que proporcionan ciertas ventajas como la regulación y control de parámetros, pérdidas mínimas de CO₂ y condiciones de cultivo que pueden ser reproducibles. Para lograr buenos rendimientos en la productividad de biomasa microalgal es necesario una iluminación adecuada en el FBR, una relación óptima superficie volumen, ciclos de luz-oscuridad y una buena y suficiente transferencia de gases. Los FBRs tubulares y de placa plana son los diseños más populares para el cultivo de microalgas [43].

Fotobiorreactor de placa plana

Los FBRs de placa plana son sistemas de cultivo de gran interés para el cultivo de microorganismos fotosintéticos ya que su geometría promueve una alta eficiencia fotosintética. Los FBRs de placa plana son construidos con materiales transparentes como vidrio, plexiglás o policarbonato, la agitación se logra por el burbujeo de aire a través de un tubo perforado colocado en la base del FBR o por agitación mecánica. La acumulación de oxígeno disuelto en el FBR es relativamente baja, son adecuados para el cultivo en masa [44] [20].

Fotobiorreactor tubular

Los FBRs tubulares son uno de los sistemas más adecuados para el cultivo al aire libre debido a su superficie de iluminación. Su construcción consiste en tubos de vidrio o plástico que permiten la fácil penetración de la luz al cultivo, la recirculación del cultivo es mediante bombas. Pueden ser verticales, horizontales o casi horizontales [44] [20].

Fotobiorreactores verticales

Los FBRs verticales consisten en un tubo de polietileno o vidrio en el cual se hace pasar aire por un compresor o una columna de burbujas. Su diseño se considera compacto, de bajo costo, de fácil operación, permite llevar a cabo cultivos bajo condiciones estériles, lo que permite su uso a escala laboratorio e industrial, además tienen un alta transferencia de masa. Debido a la orientación del reactor es importante tomar en cuenta la iluminación, la

agitación, el material de construcción que permitan siempre la transferencia de luz a lo largo de toda la geometría del FBR [43] [44].

Tabla 3.1: Tabla comparativa entre sistemas abiertos y cerrados. Elaborada con información de [35]

Característica	Sistemas abiertos	Sistemas cerrados
Riesgo de contaminación	Alto	Bajo
Producción de biomasa	Bajo	Alto
Calidad de la biomasa	Variable	Reproducible
Temperatura	Muy variable	Requiere enfriamiento
Pérdida de CO ₂	Alta	Baja
Evaporación de agua	Alta	Baja
Irradiación lumínica	Baja	Alta
Control de condiciones (pH, temperatura, etc.)	Bajo	Superior
Relación superficie/volumen	Baja	Alta
Flujo de aire/CO ₂	Bajo	Alto
Coste de instalación	Bajo	Alto
Coste de mantenimiento	Bajo	Alto
Coste de cosechado	Alto	Bajo
Escalado	Fácil	Difícil
Régimen de operación	Continuo	Semicontinuo/discontinuo

Cabinas o incubadoras de crecimiento

Son considerados también sistemas de cultivo cerrado, los cultivos se realizan en incubadoras/cabinas de crecimiento para la producción de microalgas en las que se mantiene el cultivo bajo condiciones controladas de parámetros ambientales como la temperatura y la luz. El control de la temperatura puede realizarse por medio de una combinación entre termostatos y calefactores, mientras que la luz se aplica de manera artificial por medio de lámparas fluorescentes o LED. Este sistema de cultivo se emplea generalmente para cultivos a pequeña escala pero el volumen del cultivo puede ir aumentando [45].

3.2. Factores de crecimiento

El cultivo de microalgas tiene como finalidad la obtención de biomasa para su posterior transformación, por lo que se espera que la productividad del sistema de cultivo debe ser máxima. Para cumplir con este objetivo se deben considerar factores que influyen en el óptimo crecimiento de las microalgas y en la obtención de máximos rendimientos en el cultivo. Estos

factores son: nutrientes, agitación, pH, temperatura e iluminación. Si bien estos factores son de suma importancia en el cultivo, se debe tener en cuenta siempre que cada factor influye de manera diferente de acuerdo a la especie de microalga empleada.

3.2.1. Nutrientes

El nitrógeno y fósforo son dos de los principales macro-nutrientes que deben suplirse a las microalgas para su crecimiento. El nitrógeno, al ser un componente de los ácidos nucleicos y las proteínas está relacionado al metabolismo central de las microalgas. Generalmente se suele encontrar en forma de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), urea, entre otros [30]. Las microalgas prefieren el amonio antes que los nitratos para su crecimiento, pero un medio de cultivo carente de nitratos reducirá su productividad [46]. La limitación de nitrógeno en el cultivo de microalgas puede ocasionar la decoloración de las células (disminución de las clorofilas y un aumento de los carotenoides) y acumulación de compuestos orgánicos de carbono como los polisacáridos y ciertos aceites (PUFAs) [47] [31].

El fósforo es esencial para la formación de ácidos nucleicos y la transferencia de energía bioquímica. En los medios de cultivo el fósforo puede ser incorporado en forma de fosfato (PO_4^{3-}), fosfato de hidrógeno (HPO_4^-) o dihidrógeno fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) [48] [30]. El fósforo a menudo es uno de los factores limitantes más importantes en el crecimiento de las microalgas (aunque la biomasa microalgal contiene menos del 1% de P). Esto se debe a que se une fácilmente a otros iones, lo que provoca su precipitación y en consecuencia, hace que este nutriente esencial no esté disponible para la absorción por microalgas [31].

3.2.2. Agitación

La agitación en el cultivo de microalgas es necesaria para evitar la sedimentación de la biomasa, proporcionar a las células la misma exposición a la luz y nutrientes, mejorar la productividad de las microalgas y mejorar el intercambio de gases. De lo anterior, el intercambio de gases es de suma importancia ya que el aire introducido al cultivo proporciona el CO_2 para que las células lleven a cabo la fase oscura del proceso de fotosíntesis. El CO_2 contribuye también a la regulación del pH en el cultivo [49] [50]. Además, la agitación permite la salida del oxígeno que se genera como parte del metabolismo de las microalgas, el cual puede resultar tóxico.

Sin importar la escala del cultivo, la agitación debe proporcionarse siempre, ya sea mediante la mezcla manual para cultivos a pequeña escala, ruedas de paletas, bombas y/o compresores de aire para cultivos a gran escala. Siempre se debe tomar en cuenta que todas las especies de microalgas son diferentes y algunas especies solamente pueden tolerar cierta intensidad de agitación [50].

3.2.3. Temperatura

La temperatura es un factor importante que es necesario controlar y monitorear en el cultivo de microalgas, ya que afecta directamente a la fotosíntesis, a los requerimientos nutricionales y la composición de las células [51] [52]. Como es el caso de todos los factores que influyen en el crecimiento de microalgas, la influencia de este factor dependerá de la especie.

Existen rangos de temperatura en los que las microalgas crecen de manera favorable, las especies mesofílicas más comunes de microalgas suelen tener un crecimiento favorable entre los 25 y 35°C. Las temperaturas inferiores a 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que temperaturas por arriba de los 35°C pueden provocar la muerte de algunas especies [10] [53] [54] [53].

Este factor hace necesario un sistema de control de temperatura en el cultivo para garantizar las temperaturas adecuadas para el crecimiento. En sistemas cerrados de cultivo, el control de parámetros puede lograrse con relativa facilidad en comparación con sistemas abiertos. Por ejemplo, en un sistema cerrado el cultivo puede enfriarse con baños de agua fría, o por medio de aires acondicionados, en el caso de los sistemas abiertos es algo más complicado de controlar pero cubrir los estanques de cultivo podría llegar a funcionar [50] [54].

3.2.4. Salinidad

La salinidad del medio de cultivo tiene gran influencia en el crecimiento de las microalgas, en la productividad de lípidos y otros productos de interés. La mayoría de las microalgas crecen mejor en condiciones de salinidad ligeramente más bajas que su hábitat natural [50] [46]. Las microalgas son capaces de ajustar el rango de salinidad de su medio, en general las microalgas de agua de mar pueden tolerar mayor salinidad que las microalgas de agua dulce [55] [56] [57].

3.2.5. pH

El pH del cultivo está relacionado con factores como la productividad, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂ [30] [58].

Diferentes cepas de microalgas pueden tolerar rangos de pH entre 7-9 [55] [50] [46] [30] y se consideran óptimos niveles de pH entre 8.2 y 8.7 [50] [54]. Debido a la absorción de carbono inorgánico por parte de las microalgas, el pH del cultivo puede aumentar. El cambio de pH en los medios puede limitar el crecimiento de las microalgas a través de inhibición metabólica. A pH alto, el carbono está disponible en forma de carbonatos, esto también reduce la afinidad de las microalgas por el CO₂ libre. En cultivos fotoautótrofos, el consumo de CO₂ para la fotosíntesis es más lento y provoca la disminución de la presión parcial de

CO₂, lo que resulta en un aumento en el pH. El pH alcalino da como resultado indirecto el aumento de triglicéridos y una disminución de lípidos polares asociados a la membrana debido a la inhibición del ciclo celular [59].

3.2.6. Iluminación

La luz es un factor importante en el crecimiento de las microalgas ya que la utilizan para el proceso de fotosíntesis, por lo que es necesario considerar la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo. Las microalgas no pueden usar toda la luz suministrada porque no absorben todos los fotones y demasiada luz causará la inhibición del cultivo [50].

La irradiancia que recibe cada célula está determinada por la irradiancia incidente, la geometría del reactor y el sistema de mezclado [60] [61], la profundidad y densidad del cultivo: a mayor profundidad y concentración celular, la luz debe ser la necesaria para penetrar a través del cultivo. Se considera que para cultivos a escala laboratorio, una intensidad de luz adecuada es de 1,000 luxes, mientras que para volúmenes más grandes la intensidad puede ir de los 5,000-10,000 luxes [50]. La luz puede ser suplementada al cultivo de manera natural o artificial por medio de lámparas fluorescentes o LED [50] [62].

Las microalgas absorben longitudes de onda entre los 400 a 700 nm para la fotosíntesis dependiendo de la especie. Por ejemplo, las microalgas verdes absorben la luz a través de las clorofilas en el rango de los 450-475 y 630-675 nm, y los carotenoides entre los 400-550 nm [63] [62].

3.3. Metodología

3.3.1. Microalgas

El cultivo microalgal mixto utilizado en este estudio fue colectado en una zona de lagos temporales en Ciudad Azteca en el estado de México, pertenece a la colección de cultivos del Laboratorio de Ficología Aplicada UAMI (Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa). La muestra empleada (ver figura 3.1) para el siguiente trabajo se mantuvo en el laboratorio de Bioenergía de IER-UNAM en medio Bayfolan Forte a condiciones de temperatura ambiental de la Ciudad de Temixco, Morelos con iluminación natural.

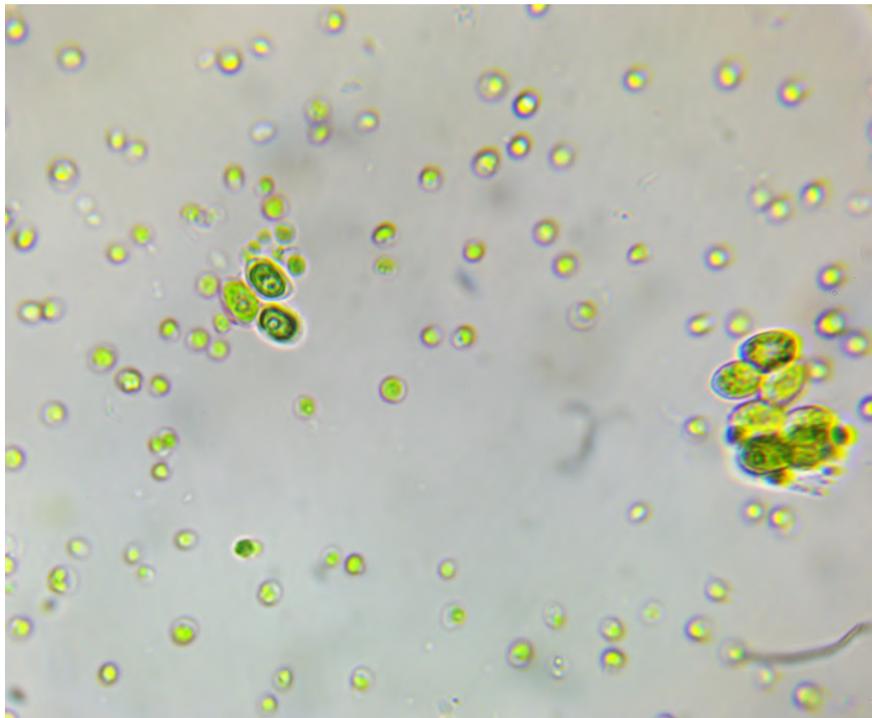


Figura 3.1: Fotografía del cultivo mixto de microalgas visto a 40X.

3.3.2. Medio de cultivo

Para todas las escalas de cultivo se empleó como medio de cultivo el fertilizante agrícola foliar Bayfolan Forte (Bayer CropScience). La composición del medio de cultivo se describe en la Tabla 3.2.

Nutriente	Concentración mg L ⁻¹
Nitrógeno total (N)	139
Nitrato	1.9
Nitrito	0.003
N-amoniacal	23
Clorhidrato de tiamina	0.0486
Fósforo (P ₂ O ₅)	97.36
Azufre (S)	2.79
Potasio como (K ₂ O)	73
Calcio (CaO)	0.30
Boro (B)	0.438
Cobalto (Co)	0.024
Cobre (Cu)	0.486
Manganeso (Mn)	0.438
Fierro (Fe)	0.608
Magnesio (MgO)	0.304
Molibdeno (Mo)	0.060
Ácido Indol Acético	0.36
Zinc (Zn)	0.973

Tabla 3.2: Composición del medio de cultivo

3.4. Sistema de cultivo

3.4.1. Fotobiorreactor

Para el cultivo microalgal se emplearon FBRs de tipo placa plana. El diseño y la construcción de los FBRs se realizó de manera conjunta. En la figura 3.2 se puede observar un esquema del diseño de los FBRs. Los FBRs fueron construidos utilizando vidrio de 6 mm de espesor. Las dimensiones de los FRBs son 60x10x50 cm.

Para el sistema de aireación de los FBRs se emplearon cortinas difusoras para acuario de neopreno (Oxi Kril) de 60 cm de largo y 13 mm de diámetro, encontrándose sujetas al fondo de los FBRs con ventosas de succión. La incorporación de los aireadores permite suministrar aire al cultivo para evitar la sedimentación y permitir la homogeneización del mismo, además de proveer la fuente de carbono en forma de CO₂.

Los FBRs cuentan con una tapa de acrílico de 5 mm de grosor desmontable para facilitar los procesos de inoculación, limpieza y esterilización. La tapa cuenta con 10 agujeros de 5 mm de diámetro que permite el intercambio de gases mientras que los FBRs están en funcio-

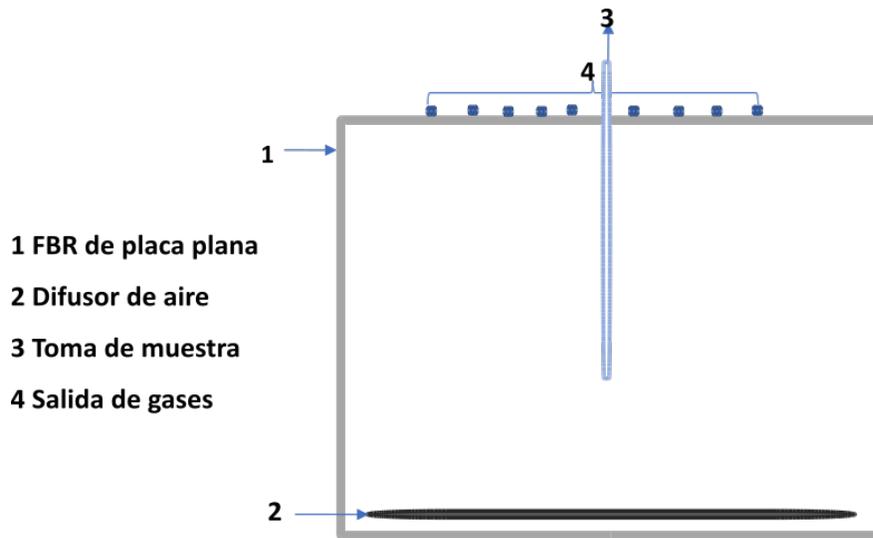


Figura 3.2: Representación esquemática del diseño de los fotobiorreactores.

namiento, evitando el aumento de presión dentro del reactor, además de permitir la salida del oxígeno que se genera como parte del metabolismo de las microalgas y cuya acumulación puede resultar tóxica.

Para la toma de muestra se incorporaron tubos de Nylon de 5 mm de diámetro al orificio central de las tapas de cada uno de los FBRs. En el anexo I se muestran los planos de los FBRs.

3.4.2. Cabina de cultivo

Para el desarrollo de este proyecto de tesis era determinante aumentar la producción de biomasa bajo condiciones controladas en el laboratorio de Bioenergía del IER-UNAM con el fin de facilitar los procesos de extracción y caracterización de compuestos de interés. Aprovechando el espacio disponible dentro del laboratorio, se llevó a cabo el diseño y construcción de una cabina de crecimiento con fotoperiodos (CCFP).

La CCFP fue fabricada con láminas de acero calibre 20 y perfiles tubulares calibre 18 en su estructura, de dos niveles, en color blanco con acabado mate en el exterior e interior, cuenta con perforaciones en una de sus paredes para la entrada y salida de cables y/o mangueras. En uno de sus laterales exteriores la CCFP cuenta con una repisa de tres niveles para la instalación de componentes para los FBRs como por ejemplo humidificadores y compresores de aire. Incluye un sistema de cuatro puertas de cierre con bisagras y cerradura, que permiten el aislamiento de la luz del exterior al interior de la cabina y viceversa. La base incluye cuatro patas con ruedas multidireccionales con sistema de frenos. En la figura 3.3 se puede observar el esquema del diseño de la cabina. En el anexo I se encuentran los planos de la CCFP.

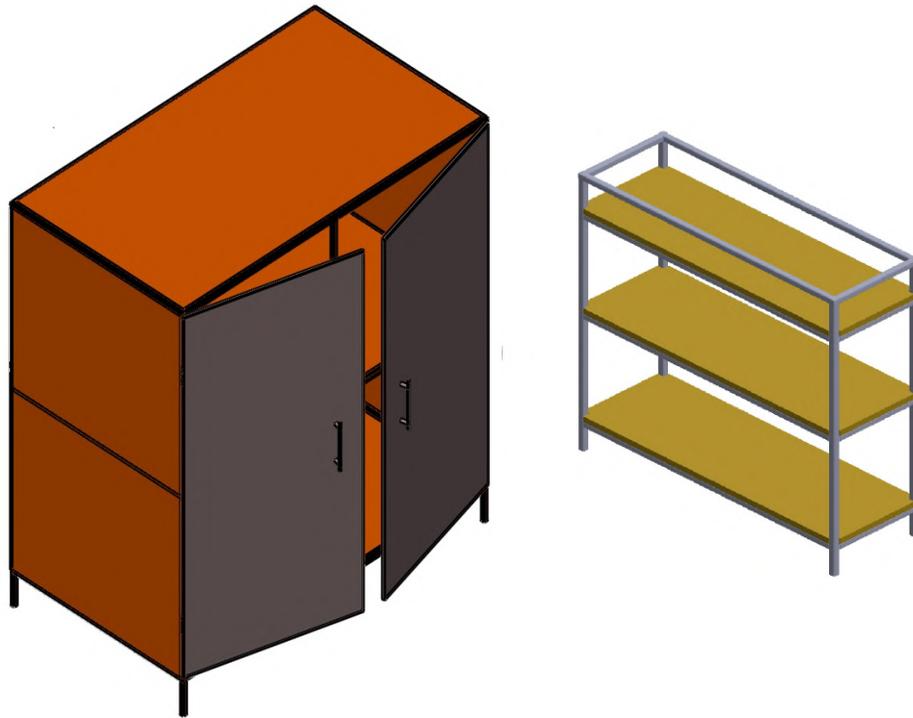


Figura 3.3: Representación esquemática del diseño de la cabina de crecimiento con fotoperiodos.

La iluminación de la CCFP es provista mediante tiras de LED de luz de día, con índice de reproducción de color (IRC) de 94 y temperatura del color de 6500 k (SIECLED), en los dos niveles. Para controlar la intensidad lumínica cuenta con un dimmer (Leviton) de 600 W. Cuenta con un sistema de interrupción horaria, para fotoperiodos, controlado a través de un timer modelo 12.62.8 (Finder).

La CCMFP esta diseñada para la instalación de dieciséis FBRs del tipo placa plana, ocho FBRs en cada nivel, con soportes en ambos niveles para cada uno de los FBRs.

La cabina se construyó en las instalaciones del taller del IER-UNAM y la instalación de las luminarias corrió a cargo de la empresa mexicana Sistemas Integrales en Electroingeniería y Control LED (SIECLED).

3.4.3. Preparación de inóculo

El cultivo de microalgas para el presente trabajo se efectuó a través de inóculos sucesivos partiendo de 1 L, seguido de 15 L, hasta alcanzar 144 L divididos en ocho FBRs de tipo placa plana con volumen de 18 L cada uno.

Preparación del inóculo de 1 L

El primer nivel de cultivo se llevó a cabo en un FBR FMT-150 (Photon Systems Instruments), con capacidad de 1 L, acoplado a un sistema de distribución de flujo de aire, potenciómetro y agitador magnético. Se usó un inóculo de 100 mL, 1 mL de fertilizante agrícola foliar Bayfolan Forte 1000X (ver composición en la Tabla 3.2) y 900 mL de agua destilada previamente esterilizada en autoclave.

El cultivo se mantuvo con agitación constante, temperatura sinusoidal que se dividió en periodos 12/12, 12 horas de 20-30 °C y 12 horas de 30-20 °C, con intensidad lumínica de 375 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en luz roja y blanca durante 24 horas. Para el seguimiento del crecimiento del cultivo se generaron mediciones automáticas de densidad óptica cada 20 minutos.

Transcurridos 11 días el cultivo del inóculo se transfirió a un matraz por gravedad (figura 3.4 (b)) y se almacenó en una incubadora Precision Plant growth chamber - modelo 818 (Thermo Fisher Scientific) hasta su posterior uso, a una intensidad luminosa de 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodos 12/12 luz/oscuridad a 19 °C, con agitación diaria de 8 horas.



(a) Crecimiento del inóculo.

(b) Inóculo 1 L.

Figura 3.4: Inóculo 1 L.

Inóculo en 15 L

Para el inóculo en 15 L se usó un FBR del tipo placa plana y se inoculó con el inóculo anterior de 1.5 L, 15 mL de fertilizante agrícola foliar Bayfolan Forte 1000X (ver composición en la Tabla 3.2) y 13.5 L de agua del grifo filtrada con un purificador de agua modelo PST-01 (Rotoplas) y esterilizada con lámpara germicida de luz ultravioleta (U60) durante 15 minutos.

El inóculo se dejó crecer con agitación constante suministrada por tres bombas de acuario. Al sistema de aireación se acopló un humidificador para evitar pérdidas por evaporación, el aire al interior del FBR era distribuido por un difusor de aire tipo cortina para acuario que se encontraba sujeto al fondo del FBR. Para evitar contaminación del cultivo se conectó un filtro de jeringa de $0.22 \mu\text{m}$ previo a la entrada del humidificador. La iluminación se suministró al cultivo de manera artificial con una lámpara LED de luz de día PAR38D-LED/18/65H (Tecnolite), en fotoperiodos 12/12 horas luz/oscuridad con intensidad lumínica de $152 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y permaneció a $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante doce días.

Transcurridos los 12 días se detuvo la agitación del cultivo y se transfirió por gravedad a tres contenedores de 5 L y debido a la densidad del cultivo al fondo del FBR, ésta fracción se cosechó en un frasco con tapa azul de 1 L. Estos contenedores fueron almacenados en una incubadora Precision Plant growth chamber - modelo 818 (Thermo Fisher Scientific) hasta su posterior uso, con fotoperiodos 12/12 luz/oscuridad a $19 \text{ }^\circ\text{C}$.

En la figura 3.5 se puede observar un diagrama de la instalación y componentes del fotobiorreactor que se empleó para el cultivo del inóculo en 15 L. La figura 3.6 muestra el sistema de cultivo del inóculo en fotobiorreactor de placa plana.

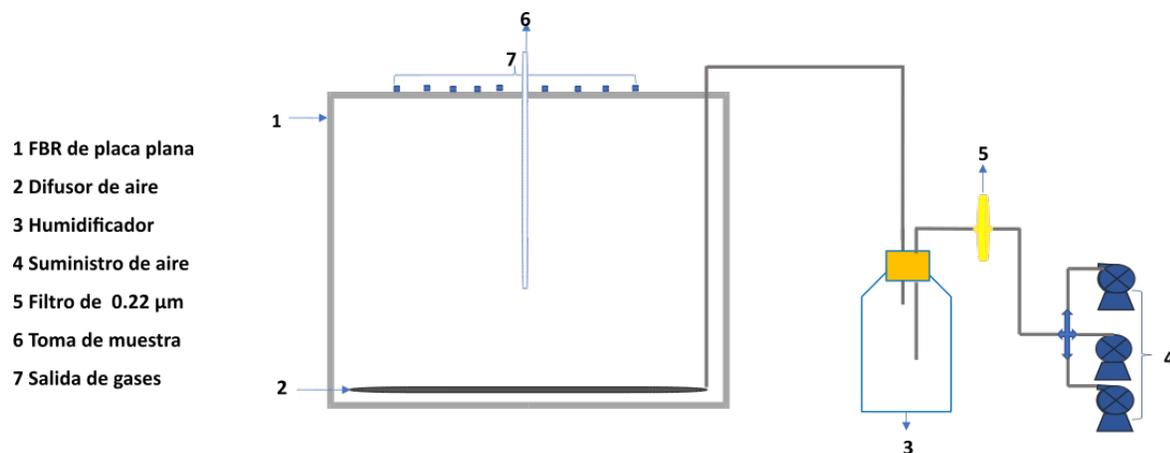
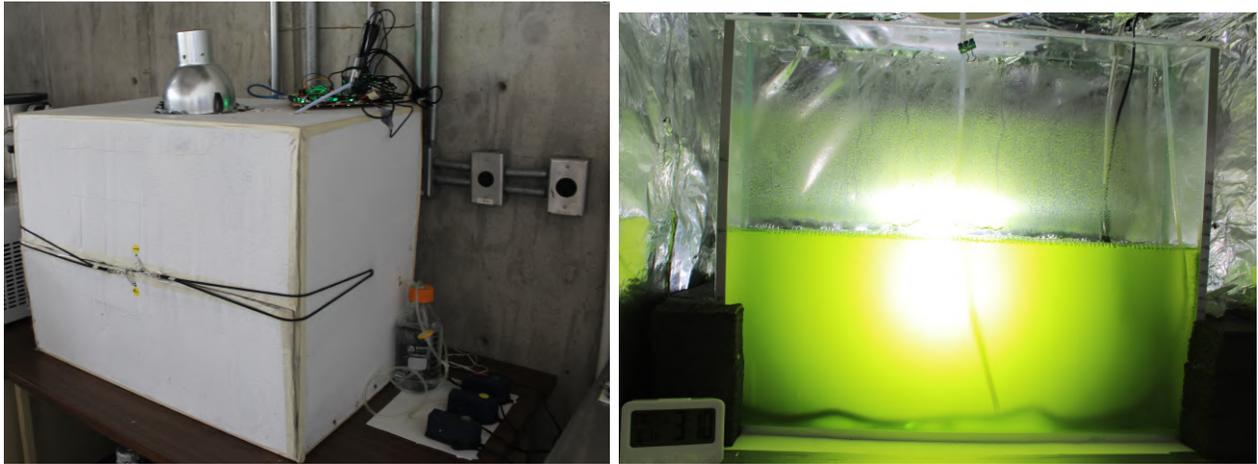


Figura 3.5: Diagrama de instalación y componentes del fotobiorreactor.



(a) Crecimiento del inóculo 15 L (exterior).

(b) Crecimiento del inóculo 15 L (interior).

Figura 3.6: Sistema de cultivo del inóculo de 15 L.

3.4.4. Cultivo de 144 L

Para el último nivel de cultivo (144 L), se empleó agua de grifo filtrada con un purificador de agua modelo PST-01 (Rotoplas). Cada FBR se llenaba con 16 L de agua y posteriormente el agua se esteriliza con una lámpara germicida de luz ultravioleta (U60) por 15 minutos dentro de la CCFP. Los 144 L de cultivo se distribuyeron en ocho FBR, cada uno recibió un inóculo de 1.8 L con una concentración celular de 12.3×10^6 cel mL^{-1} y 18 mL de fertilizante agrícola foliar Bayfolan Forte 1000X (ver composición en la Tabla 3.2).

El cultivo se dejó crecer con agitación constante suministrada por un compresor de aire modelo Acq-005 (Boyu) con ocho salidas de distribución con un flujo de 7.69 L min^{-1} de aire para cada FBR. A cada FBR se acopló un humidificador colocando un filtro de jeringa de $0.22 \mu\text{m}$ previo al mismo. El aire al interior del fotobiorreactor era distribuido por un difusor de aire tipo cortina para acuario. La iluminación se suministró al cultivo de manera artificial mediante lámparas de tiras LED (luz de día) con intensidad lumínica de $340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a una temperatura de $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

En este nivel de cultivo en la CCFP, se tomaron como unidades de evaluación cuatro de los ocho FBRs. Se tomaron muestras cada 48 horas durante catorce días para determinar el crecimiento celular, consumo de nutrientes (nitrato, nitrito, nitrógeno amoniacal y fosfatos) y concentración de clorofila *a* y carotenoides totales. En la figura 3.7 se aprecian diversas imágenes del cultivo de microalgas en la CCFP.

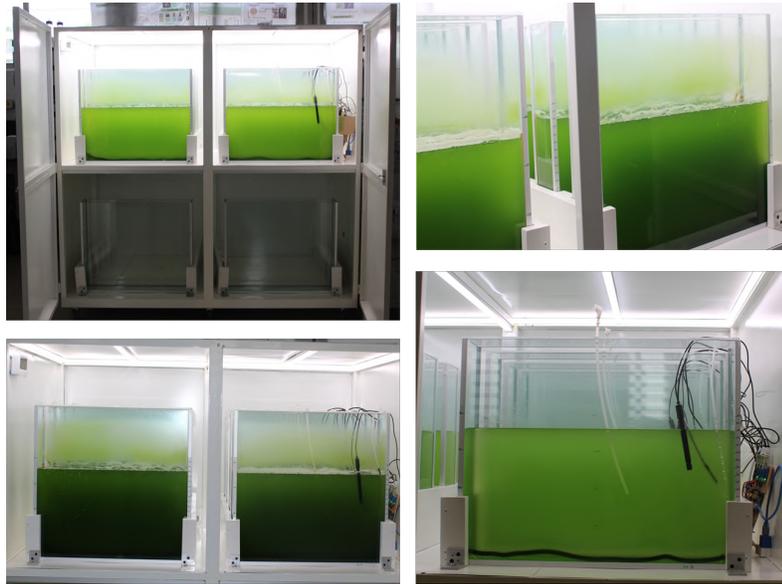


Figura 3.7: Cultivo en la cabina de cultivo con fotoperiodos.

3.5. Medición del crecimiento

El crecimiento celular se estimó a partir del conteo celular directo mediante cámara de Neubauer y por la determinación de los cambios en la densidad óptica por espectrofotometría.

3.5.1. Conteo celular

El conteo celular se realizó cada 48 horas mediante recuentos de alícuotas tomadas de los diferentes FBRs. El conteo celular se realizó con una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, bajo observación directa en un microscopio AmScope T360b con el objetivo 10X. Se contaron las células presentes en los cuadros de conteo. La concentración celular se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C = N * 10^4 * dil \quad (3.1)$$

Donde: $C = \text{células mL}^{-1}$, $N = \text{promedio de células presentes en } 1 \text{ mm}^2 (0.1\mu\text{L})$ y $dil = \text{factor de dilución}$. A partir de la concentración celular, se puede determinar el crecimiento específico del cultivo mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(X_2 - X_1)}{t_2 - t_1} \quad (3.2)$$

De acuerdo a las propiedades de los logaritmos y en vista de que la mayoría de las microalgas se reproduce mediante división binaria, la tasa de crecimiento se puede obtener

directamente el número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de biomasa [64], utilizando en la ecuación anterior logaritmos en base 2 obteniendo la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{[\ln(X_2/X_1)/\ln(2)]}{(t_2 - t_1)} \quad (3.3)$$

Donde X_1 y X_2 representan la concentración celular al t_1 y al t_2 .

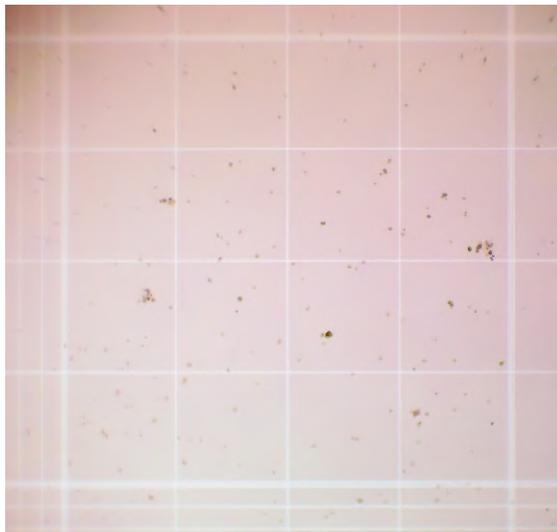


Figura 3.8: Muestra de cultivo observada con el objetivo 10X.

3.5.2. Densidad óptica

Para medir la densidad óptica del cultivo se utilizaron dos celdas de cuarzo. En una de las celdas se colocaban 1.5 mL de agua destilada como blanco y en la otra se añadían 1.5 mL de muestra del cultivo (figura 3.9). Las celdas se colocaban en los soportes del espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) y se medía la absorbancia en un rango de 400-800 nm. El valor de absorbancia que se tomó para hacer el seguimiento del cultivo fue el de 750 nm, donde no existe interferencia por pigmentos.



Figura 3.9: Muestra tomada al día ocho de cultivo.

3.6. Determinación de pigmentos

La determinación del contenido de clorofila *a* y carotenoides totales del cultivo de microalgas se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se tomaban muestras de 1.5 mL de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se centrifugaban a 13,500 rpm durante 5 minutos en una centrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf) eliminando posteriormente el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendía con 1.5 ml de metanol y posteriormente se pasaba a un baño de ultrasonido durante 7 minutos, trascurrido el tiempo cada tubo Eppendorf se agitaba en vórtex por 1 min y los tubos se cubrían con papel aluminio para impedir el paso de la luz y se almacenaban durante 24 horas a 4 °C. Las lecturas se realizaban por duplicado.

Pasadas las 24 horas, las muestras se retiraban de refrigeración evitando movimientos bruscos. La determinación de clorofila *a* y carotenoides totales se realizó con el sobrenadante (figura 3.10) midiendo la absorbancia de 400-700 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu), usando metanol como blanco. El contenido de clorofila *a* y carotenoides totales en $\mu\text{g mL}^{-1}$ se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones propuestas por [65] y [66] respectivamente:

$$Cl_a = 15.65_{A666} \quad (3.4)$$

$$Carotenos_{totales} = \frac{1000_{A470} - 44.76_{A666}}{221} \quad (3.5)$$



Figura 3.10: Extracción de pigmentos con metanol.

3.7. Consumo de nutrientes

3.7.1. Determinación de Nitrato

El método empleado fue la reducción por cadmio, con un límite máximo de detección de 30 mg L^{-1} de $\text{NO}_3\text{-N}$. Para éste método, el cadmio metálico reduce a nitritos los nitratos de la muestra. El ion de nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio. Esta sal se une al ácido géntísico para formar un producto de color ámbar [67].

Para la determinación de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) se prepararon muestras de 10 mL (1:10), a las cuales se añadía un sobre de polvo reactivo NitraVer 5 (HACH) y se agitaban durante un minuto, posteriormente se dejaban reaccionar por 5 minutos. Transcurridos los 5 min las muestras se medían en el colorímetro portátil modelo DR 900 (HACH) y se registraba el dato de la medición en mg L^{-1} .

3.7.2. Determinación de Nitrito

Se usó el método de diazotización con un límite máximo de detección de 0.3000 mg L^{-1} de $\text{NO}_2\text{-N}$. En este método el nitrito en la muestra reacciona con el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia. Esta se acopla al ácido cromotrópico para producir un complejo de color rosa directamente proporcional a la cantidad de nitrito presente [67].

Se empleaban muestras de 10 mL (1:10) para la determinación de $\text{NO}_2\text{-N}$, cada muestra se hacía reaccionar con un sobre de polvo reactivo NitraVer 3 (HACH), se agitaba hasta disolver y la muestra se dejaba reaccionar por un periodo de 20 minutos. Trascurrido el tiempo las muestras se medían en el colorímetro portátil modelo DR 900 (HACH) y se registraba el dato de la medición en mg L^{-1} .

3.7.3. Determinación de Nitrógeno amoniacal

Se utilizó el método salicilato con un límite máximo de detección de 50 mg L^{-1} de $\text{NH}_3\text{-N}$. En este método los compuestos de amonio son combinados con clorina para formar monoclorina. La monoclorina reacciona con el salicilato para formar 5-aminosalicilato, el cual es oxidado en presencia de un catalizador de nitroprusiato de sodio para formar un compuesto de color azul. El color azul es enmascarado por el color amarillo del reactivo y da como color final una solución en color verde [68].

Para la determinación de nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) se emplearon muestras de 0.1 mL de cultivo previamente centrifugada a 13,500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Mini Spin Plus (Eppendorf). El sobrenadante se añadió a un tubo reactivo junto con un sobre de polvo de salicilato de amonio y uno de cianurato amonio (HACH), se agitó hasta disolver y las muestras se dejaron reaccionar por 20 minutos. Transcurrido el tiempo las muestras se medían en el colorímetro portátil modelo DR 900 (HACH) y se registró el dato de la medición en mg L^{-1} .

3.7.4. Determinación de Fosfato

Se usó el método de digestión con persulfato ácido con un límite máximo de detección de 3.50 mg L^{-1} de PO_4^{3-} . El método empleado consiste en que la presencia de fosfato en forma orgánica e inorgánica condensada (meta-, piro- u otros polifosfatos) debe convertirse a ortofosfato reactivo antes del análisis. El pretratamiento de la muestra con ácido y calor proporcionan las condiciones para hidrólisis de las formas inorgánicas condensadas. Los fosfatos orgánicos se convierten a ortofosfatos calentándolos con ácido y persulfato. El ortofosfato reacciona con molibdato en un medio ácido para producir un compuesto de fosfomolibdato. El ácido ascórbico luego reduce el compuesto, produciendo un color azul intenso de molibdeno [67].

Para la determinación de fosfato (PO_4^{3-}) se emplearon muestras de 10 mL (1:100) a las cuales se les añadía un sobre de persulfato de potasio para fosfonato (HACH) y se agitaban hasta disolver, posteriormente se calentaban a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos en un digestor modelo DRB200 (HACH). Transcurrido este tiempo las muestras se retiraban del reactor y se dejaban enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se agregaban 2 mL de hidróxido de sodio 1.54 N y un sobre de polvo reactivo PhosVer 3 (HACH) al tubo con muestra, se agitaba hasta disolver y se esperaban 2 minutos como periodo de reacción. Transcurrido el tiempo las muestras se medían en el colorímetro portátil modelo DR 900 (HACH) y se registraban los datos de las mediciones en mg L^{-1} .

3.8. Cosecha y secado

Transcurridos catorce días de cultivo se detuvo la aireación de cada uno de los FBRs y la iluminación en la cabina de crecimiento. La biomasa se transfirió a garrafones de plástico con capacidad de 20 L. El cultivo se centrifugó en un solo lote en una centrifuga tubular modelo AS16 (Super Sharples) a 15,000 rpm, con un flujo de alimentación de 70 L h^{-1} (figura 3.11).

La biomasa se recuperó en forma de pasta de la membrana de teflón de la centrifuga y se registró el peso de la biomasa húmeda. Posteriormente la biomasa se transfirió a una charola metálica para su secado en un horno con temperatura oscilante entre 42 y 60°C durante 72 horas, se registró el peso de la biomasa seca (figura 3.12), se recolectó y se almacenó en un lugar fresco y seco hasta su uso.

El proceso de centrifugación y secado de biomasa se llevó a cabo en las instalaciones de planta piloto del Instituto de Biotecnología de la UNAM.



Figura 3.11: Cosecha y centrifugación del cultivo.



(a) Biomasa húmeda.

(b) Biomasa seca.

Figura 3.12: Biomasa obtenida.

3.9. Resultados y discusión

3.9.1. Seguimiento de crecimiento celular

La dinámica de crecimiento en los cultivos de microalgas se describe en la figura 3.13, donde se esquematiza la fase lag o de adaptación (**1**), exponencial (**2**), declinación del crecimiento (**3**), estacionaria (**4**) y muerte(**5**) [69].

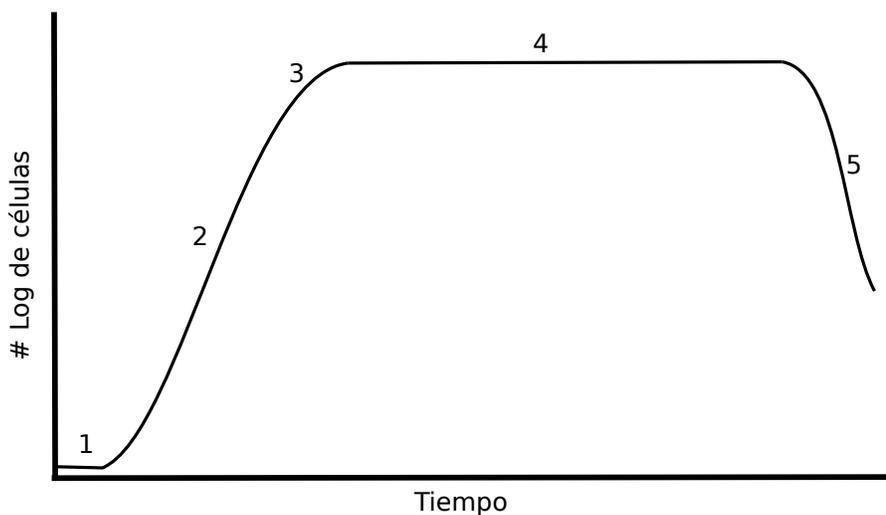


Figura 3.13: Dinámica de crecimiento en microalgas.

La temperatura, el pH, la salinidad, la irradiancia y los nutrientes, son los principales factores que influyen en la calidad y cantidad del cultivo. En el presente trabajo las microalgas crecieron en un ambiente de iluminación de $340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proveniente de luz de tiras LED (luz de día), a una temperatura de $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando fertilizante agrícola foliar Bayfolan Forte como medio de cultivo.

La curva de crecimiento se realizó utilizando los conteos celulares cada 48 horas. En la figura 3.14, se muestra el promedio contabilizado de cuatro muestras del día cero al día catorce con su correspondiente barra de error.

En la figura 3.14 se observa la disminución de la concentración celular el día cuatro. En la figura 3.15 se observa el decaimiento de la velocidad específica de crecimiento el mismo día. Esto llevó a la decisión de reinocular el cultivo por lo que el día cinco se añadieron 100 mL de un nuevo inóculo que tenía una concentración celular de $65.3 \times 10^6 \text{ Cel mL}^{-1}$ a cada FBR. A partir del día cinco y hasta el día catorce se observa la continuidad en el crecimiento celular demostrado por la suma progresiva de las duplicaciones celulares (Figura 3.15).

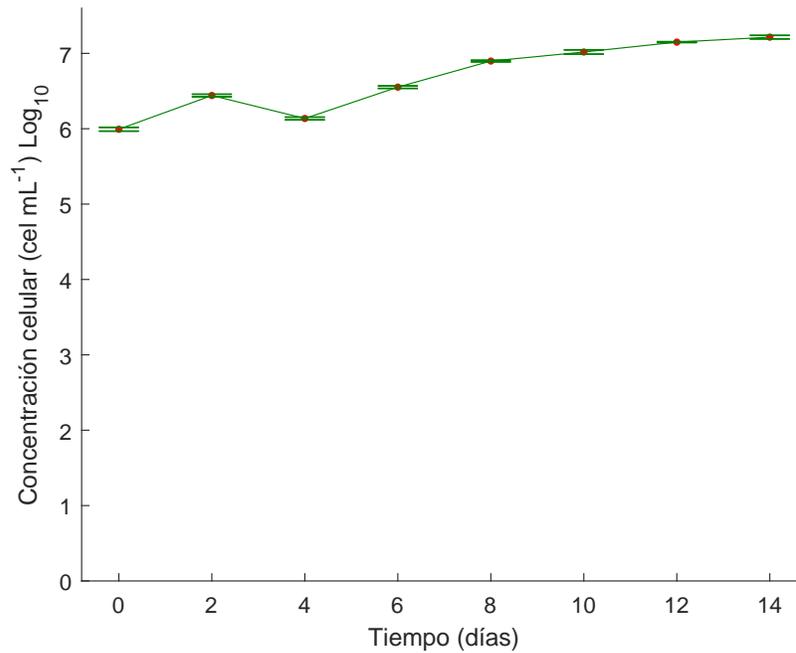


Figura 3.14: Crecimiento celular

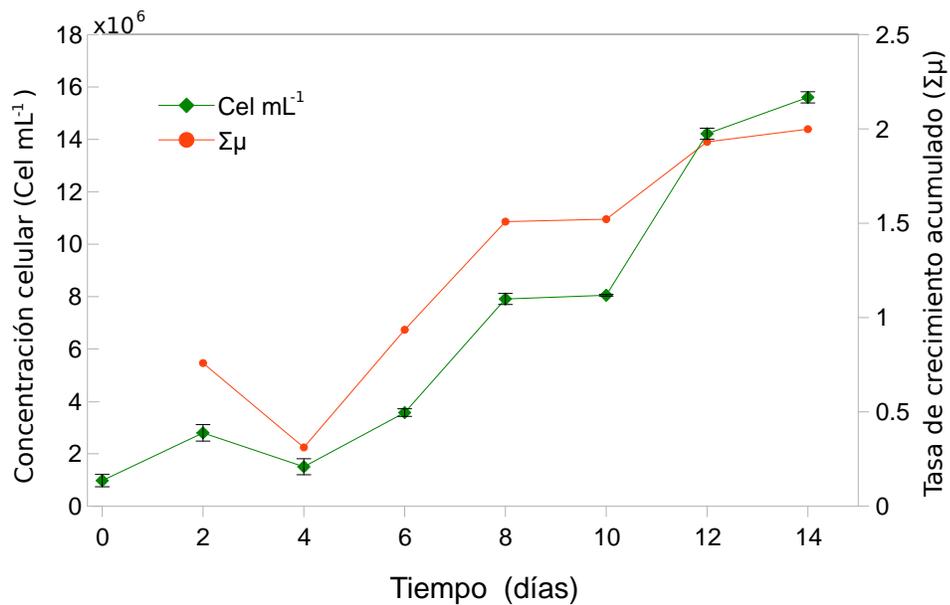


Figura 3.15: Crecimiento del cultivo. Concentración celular en Cel mL^{-1} (línea color verde) cada punto representa el promedio de cuatro réplicas y su respectiva barra de error. Suma progresiva de duplicaciones celulares (línea color anaranjado).

Por otro lado, para poder saber si es posible determinar la producción de biomasa de forma indirecta mediante los valores de densidad óptica, se puede determinar la correlación que existe entre los datos obtenidos por conteo celular directo en el microscopio y los datos de absorbancia a 750 nm donde no existen interferencias con pigmentos. En este trabajo se utilizó el método de regresión lineal. El uso de este método para evaluar la producción de biomasa podría estar sujeto a ciertos errores, por lo que es importante el uso adecuado del microscopio y cámara de Neubauer si no se tiene un cultivo monoalgal y axénico. Si bien el recuento celular puede ser una práctica tediosa, nos permite conocer la morfología, el tamaño, estado reproductivo y fisiológico de las células, así como también la presencia de contaminantes [70].

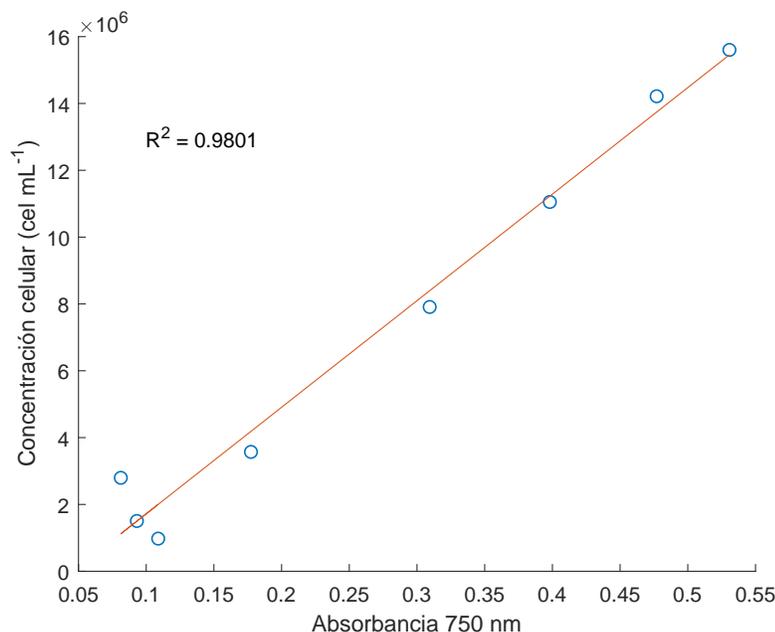


Figura 3.16: Correlación de la concentración celular contra la densidad óptica a 750 nm.

En la Figura 3.16 se puede observar la linealidad entre la concentración celular (Cel mL^{-1}) y la absorbancia a 750 nm con un $R^2 = 0.9801$ en este trabajo. Si bien es cierto que la correlación está por arriba del 0.90, la precisión de los resultados puede no ser confiable, ya que se sabe que en cultivos de cepas puras se reportan valores de $R^2 = 0.99$. Un ejemplo de ello es la correlación encontrada por Lu et al. (2017) para el cultivo de cinco especies de microalgas en donde obtiene valores de $R^2=0.99$ para cada uno de los casos [71].

En diferentes estudios previos realizados con el cultivo mixto empleado en este trabajo y utilizando diferentes condiciones de cultivo como: intensidad luminosa, temperatura y volumen de cultivo, se observaron caídas drásticas de la concentración celular a partir del día quince. Esto también se observó en cultivos posteriores realizados en la CCFP. Dichos resultados no están incluidos en este trabajo, sin embargo se logró una condición donde se

obtuvo biomasa suficiente para la siguiente etapa del proyecto que era la extracción de carotenoides en condiciones supercríticas. Se obtuvieron 34.5 g de biomasa seca. Esto representa un aumento de 9.6 veces en la capacidad de producción de biomasa al pasar de un FBR de 15 L a ocho FBRs con 18 L de cultivo cada uno.

3.9.2. Concentración de pigmentos

La determinación de pigmentos se realizó sobre muestras del cultivo tomadas cada 48 horas. Para realizar el cálculo de la concentración de pigmentos se requirió del espectro de absorbancia de los pigmentos extraídos utilizando metanol.

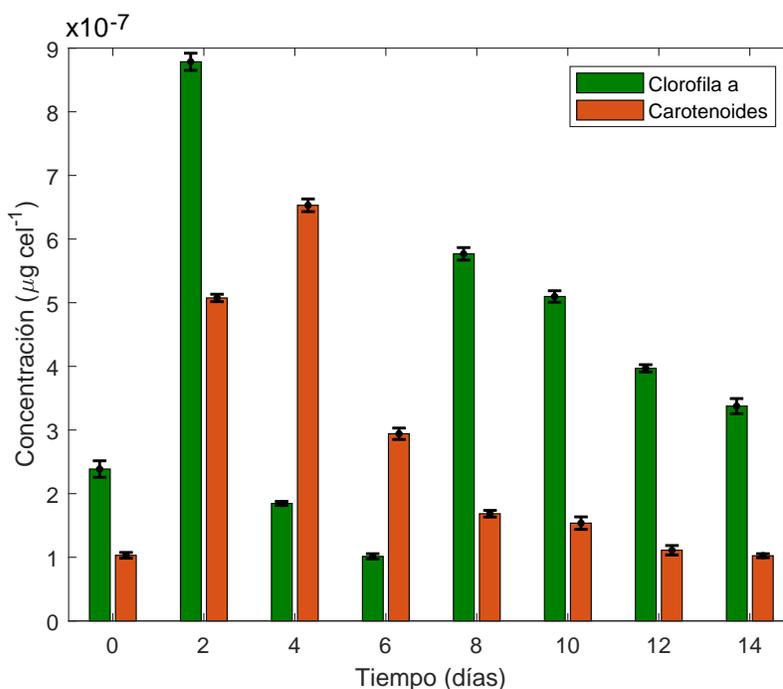


Figura 3.17: Concentración de pigmentos del día 0 a 14 de cultivo. Concentración de clorofila a (barras color verde). Concentración de carotenoides (barras color anaranjado).

En la figura 3.17 se aprecia que la concentración de clorofila *a* el día cero fue de $2.39 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$. El día dos la concentración de clorofila *a* aumentó a $8.78 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$. Posteriormente el día cuatro se observa una disminución de la concentración celular (Figuras 3.14 y 3.15). En los días seis y ocho se observa el aumento de la concentración de clorofila que concuerda con el crecimiento celular luego de la reinoculación el día cinco (Figuras 3.14 y 3.15). A partir del día ocho con una concentración de $5.76 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$ y hasta el día catorce se observa la disminución hasta un valor de $3.37 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$. Este comportamiento no correlaciona con el aumento en la concentración celular (Figuras 3.14 y 3.15), lo

que descarta el seguimiento de clorofila para la determinación de acumulación de biomasa.

También en la figura 3.17 se aprecia también la concentración de carotenoides por célula conforme al paso de los días, el día cuatro la concentración de carotenoides aumentó a $6.53 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$. Finalmente se observa un decremento a partir del día seis de $2.94 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$ y hasta $1.02 \times 10^{-7} \mu\text{g Cel}^{-1}$ el día catorce.

El contenido de pigmentos en las microalgas no es una característica estable ya que puede variar conforme a la velocidad de crecimiento, las condiciones ambientales y la fase de crecimiento. Esto está relacionado principalmente con una mejor absorción de nutrientes por parte de las células, especialmente el nitrógeno para estimular la producción de clorofila [72][73]. La acumulación de clorofilas puede estar asociada a una mejor disponibilidad y/o absorción de nutrientes, mientras que el aumento de carotenoides se pudiera considerar como una respuesta al estrés por las condiciones de intensidad lumínica que reciben las células [74] [75] y coincide con el máximo valor de carotenoides observado el día cuatro (Figura 3.17) cuando la concentración celular fue más baja (Figuras 3.14 y 3.15).

3.9.3. Consumo de nutrientes

Consumo de fósforo

Uno de los principales nutrientes necesario en el crecimiento de la microalga es el fósforo. La Figura 3.18 muestra la capacidad de asimilación de fosfato que presentó el cultivo microalgal.

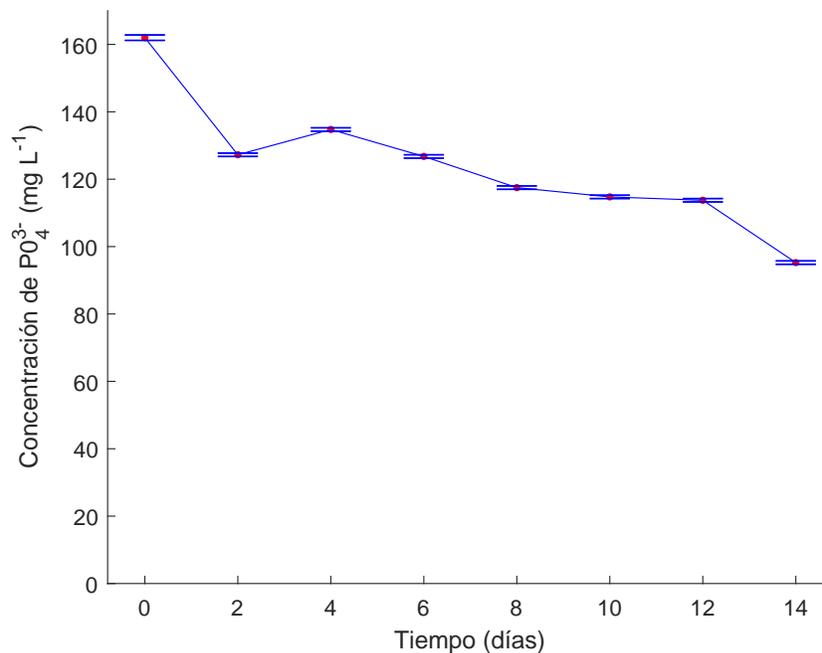
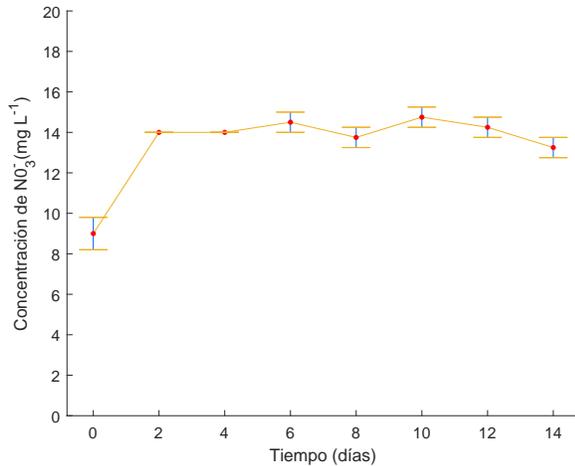


Figura 3.18: Variación de la concentración de $P0_4^{3-}$.

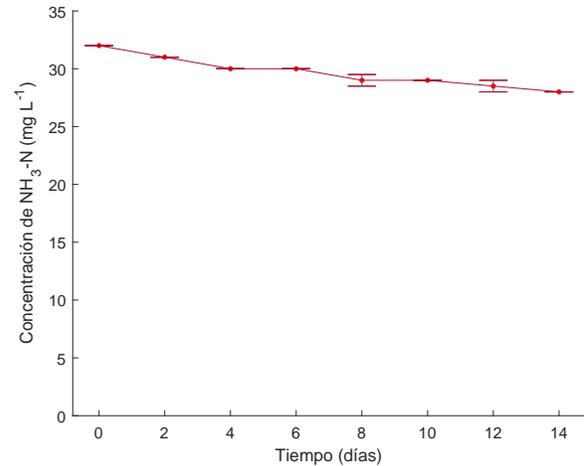
Partiendo de una concentración inicial de $162 \pm 0.81\ mg\ L^{-1}$ de fosfato ($P0_4^{3-}$), se observa que con el paso de los días la concentración de $P0_4^{3-}$ va disminuyendo llegando a una concentración final de $95.25\ mg\ L^{-1}$ para cada FBR como se observa en la figura 3.18. Como es de esperarse el consumo de fosfatos tiene un impacto en el crecimiento de las microalgas (Figuras 3.14 y 3.15), ya que a medida que la concentración celular aumenta se reduce la presencia de este nutriente en el cultivo. El fósforo no ha limitado el crecimiento de las microalgas en el presente estudio. La concentración de fosfato disminuyó, pero no se agotó. El fósforo es una parte integral de los ácidos nucleicos y las membranas biológicas y actúa como un sustrato portador de energía química (ATP) en el citoplasma [73].

Consumo de nitrógeno

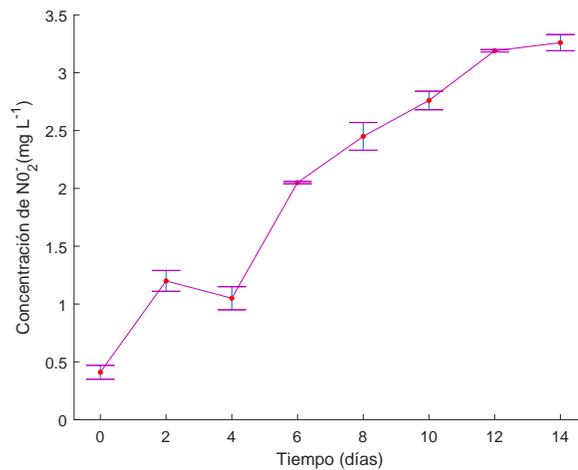
Para evaluar el consumo de nitrógeno como se mencionó anteriormente, se evaluó el consumo de $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ y $\text{NH}_3\text{-N}$. En las gráficas 3.19 se puede observar el consumo de estos nutrientes conforme al paso de los días.



(a) Consumo de nitrato



(b) Consumo de N-amoniacoal



(c) Consumo de nitrito

Figura 3.19: Variaciones de las concentraciones de a) nitrato, b) nitrógeno amoniacoal y c) nitrito durante el crecimiento celular. Cada punto en las curvas representa el promedio de cuatro réplicas y su respectiva barra de error.

En la figura 3.19 (a) se puede observar las variaciones en la concentración de $\text{NO}_3\text{-N}$. Primeramente se observa un aumento que va de 9 ± 0.81 a 14 mg L^{-1} entre el día cero y dos;

posteriormente del día dos al catorce se observan cambios en la concentración de $\text{NO}_3\text{-N}$ que oscilan entre 13 y 14 mg L^{-1} .

Para el caso de la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$, en la figura 3.19 (b) se puede observar una disminución gradual en la concentración pasando de 32 a 28 mg L^{-1} en los catorce días de cultivo, lo anterior se traduce en una reducción de la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ de 4 mg durante todo el experimento ($0.285 \text{ mg día}^{-1}$).

Finalmente en la figura 3.19 (c), se puede observar que la concentración de $\text{NO}_2\text{-N}$ en el medio aumenta desde el inicio hasta el final del experimento pasando de una concentración inicial de 0.41 ± 0.063 a $3.36 \pm 0.076 \text{ mg L}^{-1}$ el día catorce.

En cuanto al comportamiento en la concentración de $\text{NO}_3\text{-N}$, se observaron ligeras fluctuaciones entre el día dos y catorce. Sin embargo, se logra observar la disminución del $\text{NH}_3\text{-N}$ a partir del día cero y hasta el día catorce de cultivo. Estudios sobre el consumo de amonio y nitrato por diferentes microalgas indican que cuando ambas fuentes de nitrógeno están presentes en el mismo medio, el amonio es consumido preferentemente debido al menor costo energético que su consumo implica [76] [77]. Además, en presencia de amonio el consumo de $\text{NO}_3\text{-N}$ puede ser reducido e incluso inhibido debido a que las enzimas encargadas de su consumo permanecen inactivas por el proceso de asimilación de amonio. Y el consumo de $\text{NO}_3\text{-N}$, tiende a ser importante cuando el amonio es consumido casi en su totalidad, ya que se activa la enzima nitrato reductasa [78] [79] [80]. Lo anterior puede tener una relación con lo observado en las concentraciones de $\text{NO}_2\text{-N}$, debido a que la presencia de $\text{NO}_3\text{-N}$ y el $\text{NH}_3\text{-N}$ en el medio las microalgas pudieron acumular altas concentraciones $\text{NO}_2\text{-N}$ de forma intracelular que posteriormente excretaron para evitar sus efectos tóxicos. Lourenço et al. (1997) y Lomas et al. (2000), observaron un comportamiento similar en el cultivo de *T. gracilis* y diatomeas y flagelados respectivamente, cuando los cultivos eran ricos en fuentes de nitrógeno [81] [82].

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que a pesar que el $\text{NO}_3\text{-N}$ y el $\text{NH}_3\text{-N}$ se encuentren presentes en el medio, las microalgas prefieren el consumo de amonio como forma de nitrógeno y que el $\text{NO}_3\text{-N}$ llega a ser consumido en muy bajas concentraciones. Valenzuela et al. (2005) observó un comportamiento similar en el cultivo de *Rhodomonas sp* [78].

Las fuentes de nitrógeno y fósforo presentes en el medio de cultivo utilizado no se agotaron, su consumo es del 41 % para fosfatos y 12 % para amonio respectivamente. Por lo que se podría utilizar un medio formulado con la concentración adecuada de sales de amonio y fosfatos que eviten el desperdicio de nutrientes que además pueden ser contaminantes en la descarga de los residuos.

Biorrefinería: Obtención de metabolitos de alto valor

4.1. Biorrefinerías de microalgas

Las microalgas representan una materia prima potencial para la producción de biocombustibles, debido a que es posible la obtención de biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno a partir de las mismas, ya sea por conversión termoquímica o bioquímica [83]. Sin embargo, debido a los altos costos de producción, la generación de bioenergía a gran escala a partir de microalgas no es económicamente rentable y todavía no es competitiva con los combustibles a base de fuentes fósiles.

Por otra parte, la biomasa microalgal es actualmente empleada para la extracción de productos de alto valor con uso en cosméticos, suplementos alimenticios, alimentos, pigmentos y productos para la salud. Bajo este contexto, una manera rentable para la obtención de biocombustibles de microalgas es la producción simultánea de productos de alto valor y coproductos bajo el concepto de biorrefinerías [24]. Una biorrefinería de microalgas consiste en un proceso que integra instalaciones y equipos para convertir a la biomasa microalgal en biocombustibles y productos de altos valor como proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos, todos estos derivados con gran importancia en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica [84].

4.2. Microalgas y carotenoides

Los carotenoides son pigmentos terpenoides, liposolubles, compuestos por 8 unidades de isopreno. Son responsables de la coloración amarilla brillante, anaranjada y roja en frutas, verduras, micro y macroalgas y crustáceo [85] [86] [87]. Contienen cadenas de polieno cromóforo que dan lugar a los diferentes colores. Son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos tales como: algunas bacterias, plantas y algas, también, por algunos organismos no fotosintéticos, como bacterias y hongos [85]. También son denominados pigmentos accesorios o secundarios. En organismos fotosintéticos son importantes para la captación de

luz y la protección de éstos ante la fotooxidación [88] [89].

Los carotenoides se clasifican principalmente en dos tipos: (i) carotenos, constituidos por hidrógeno y carbono como por ejemplo el α -caroteno, β -caroteno y licopeno y (ii) xantófilas, compuestos por hidrógeno, carbono y oxígeno como es el caso de la luteína, zeaxantina, neoxantina, violoxantina, flavoxantina y fucoxantina. La estructura de estos compuestos puede verse en la figura 4.1, donde se muestran ejemplos de cada grupo [90] [85] [91] [92].

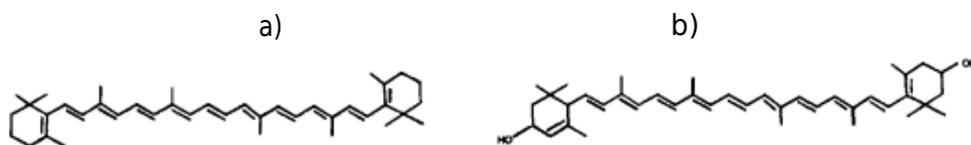


Figura 4.1: Estructuras moleculares de los carotenoides **a)** Carotenos (β -caroteno), **b)** Xantófilas (Luteína). Adaptado de: Jin et al. (2013 [90]).

En los últimos años la demanda de carotenoides está en aumento debido a su importancia en la salud humana, la industria cosmética, nutracéutica y alimentación animal. Los carotenoides que se comercializan en la actualidad provienen de síntesis química, lo que provoca incertidumbre entre los consumidores, misma que ha impulsado la demanda en el mercado de carotenoides obtenidos a partir de fuentes naturales [93] [94] [25] [85].

Las microalgas marinas han sido estudiadas como una fuente natural y sostenible para la obtención de carotenoides, ya que ofrecen ventajas de costo, escala, tiempo y rendimiento sobre las fuentes naturales que convencionalmente se emplean para la extracción de carotenoides [34] [85] [95]. En la figura 4.2 se muestra una gráfica comparativa del contenido de carotenoides de algunos frutos, vegetales, flores y especies de microalgas.

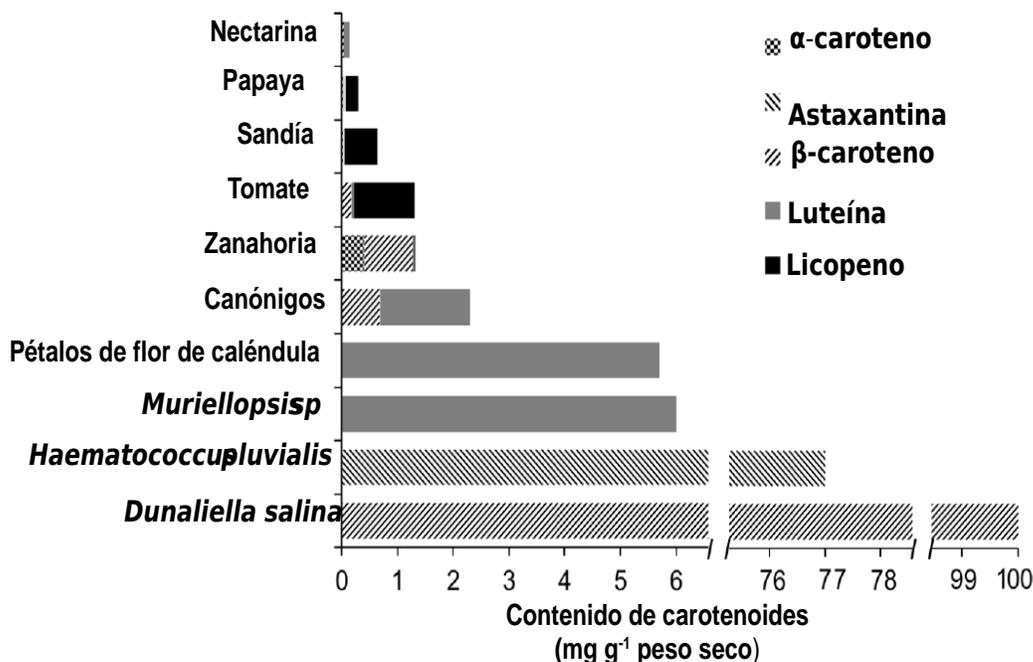


Figura 4.2: Contenido de carotenoides en diferentes fuentes naturales. Adaptado de: Mulders et al. (2014) [34].

En las microalgas, los carotenoides se pueden clasificar en carotenoides primarios y secundarios, según su metabolismo y función. Los carotenoides primarios son componentes estructurales y funcionales en el aparato fotosintético de la célula y son esenciales para la supervivencia celular. Por su parte, los carotenoides secundarios se refieren a pigmentos extraplásticos, producidos a través de la inducción de la carotenogénesis, mediante condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes, alta salinidad, luz, etc. [96] [97] [98]. Son considerados carotenoides primarios el α -caroteno, β -caroteno, luteína, fucoxantina, violaxantina, zeaxantina y neoxantina, y carotenoides secundarios la astaxantina, cantaxantina y equinonona [99] [85].

Los carotenoides, ya sean primarios o secundarios, son considerados de importancia por sus posibles aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética, por sus propiedades de pigmentación, antioxidantes, biológicas, entre otras. En la tabla 4.1 se muestran ejemplos de carotenoides producidos por diferentes tipos de microalgas y su uso potencial.

Tabla 4.1: Pigmentos de microalgas y su potencial aplicación [100].

Grupo de pigmentos	Nombre	Microalga	Color	Aplicación
Carotenoides (Carotenos)	β - carotenos	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Dunaliella bardawil</i> , <i>Botryococcus braunii</i>	Amarillo	Provitamina A; antioxidante; aditivo alimentario E160a; coloración de la yema de huevo
Carotenoides (Tocoferol)	α - tocoferol	<i>Chlorella sp</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Stichococcus bacillaris</i> , <i>Euglena gracilis</i>	Café	Vitamina E; aditivo alimentario E306, E307, E308; antioxidante en cosméticos y alimentos
Carotenoides (Carotenos)	Bixina	<i>Dunaliella salina</i>	Ámbar	Aditivo alimentario E160b (colorante); productos cosméticos
Carotenoides (Xantofilas)	Violaxantina	<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Nannochloropsis sp</i>	Naranja	Aditivo alimentario E160b
Carotenoides (Xantofilas)	Astaxantinas	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Botryococcus braunii</i>	Salmón- rojizo	Aditivo alimentario E161j; antioxidante; cultivo de salmón y trucha (color, respuesta inmune)
Carotenoides (Xantofilas)	Fucoxantina	<i>Chlorella protothecoides</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i> , <i>Botryococcus braunii</i> , <i>Chlorococcum citriforme</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Muriellopsis sp</i> , <i>Neosporangiococcum gelatinosum</i> , <i>Phaeophyceae</i>	Amarillo- naranja	Aditivo alimentario E161b; coloración amarilla de yema de huevo; pigmentación de tejidos animales; farmacéutico: degeneración anti-macular, cáncer de colon; cosméticos: coloración

Tabla 4.1. Continuación.

Carotenoides (Xantofilas)	Zeaxantina	<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Nannochloropsis salina</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i>	Oro-naranja	Aditivo alimentario E161g; cultivo de salmónidos y pollos; pastillas bronceadoras.
Ficobilinas	Ficocianina	<i>Cyanobacteria</i> , <i>Porphyridium</i>	Rojo	Técnicas de inmunofluorescencia; etiquetas para anticuerpos; receptores y otras moléculas biológicas.

La astaxantina, zeaxantina, β -carotenos, fucoxantina, cantaxantina y luteína son los carotenoides presentes en las microalgas con mayor importancia en términos comerciales [11].

4.2.1. Aplicaciones de los carotenoides

Salud humana

Los carotenoides presentes en las microalgas tienen actividad antioxidante y muchos estudios han comprobado sus beneficios para la salud humana. La adición de carotenoides a la dieta contribuye a la defensa antioxidante de humanos y animales [101]. El β -caroteno ayuda a disminuir los efectos dañinos de los radicales libres, los cuales se asocian a varias formas de cáncer. La luteína y la zeaxantina se relacionan a la disminución del riesgo de enfermedades crónicas como cataratas, la degeneración macular, la arterioesclerosis y también en la prevención del cáncer [102] [11] [103].

Industria alimentaria

Los carotenoides y especialmente el β -caroteno se pueden utilizar como pigmentos en alimentos y bebidas para mejorar su apariencia para los consumidores, como jugos de frutas, refrescos, confitería, margarina, productos horneados y lácteos. También se pueden utilizar en la formulación de alimentos saludables, gracias a sus propiedades antioxidantes. Además, los carotenoides se pueden aplicar a la alimentación animal para el enriquecimiento del color amarillo en los huevos, para mejorar el color de las aves, peces y crustáceos, mejorar la apariencia de los alimentos para mascotas [104] [101] [105].

Valor comercial de los carotenoides

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años la producción de carotenoides se ha convertido en uno de los mercados más importantes en la biotecnología de microalgas, debido a que la demanda de carotenoides a partir de fuentes naturales está en aumento. Esto ha generado grandes esfuerzos para mejorar la producción de carotenoides de fuentes biológicas [106]. De acuerdo a lo publicado por Business Communications en marzo del 2008, el mercado global de carotenoides alcanzó \$766 millones de dólares, con expectativas de aumentar a \$1.53 mil millones para 2021 [11] [107]. Particularmente los ingresos del mercado de la astaxantina para alimentación animal y la industria nutracéutica fue de \$300 y 30 millones de dólares en 2009 y se espera que aumente a \$800 y 300 millones de dólares para 2020 respectivamente. Para el caso del β -caroteno y la luteína se estimaron ingresos de \$334 y 309 millones de dólares en 2018 respectivamente [107]. Actualmente el precio del β -caroteno purificado obtenido de fuentes naturales alcanza precios en el mercado de entre \$1,000 y 2,000 dólares por kilo contra el β -caroteno obtenido de manera sintética que alcanza precios que van de entre los \$200 y 400 dólares [108].

4.3. Métodos de extracción de carotenoides

Los carotenoides producidos por algas generalmente se localizan en el cloroplasto o se acumulan en vesículas, matriz citoplásmica o se unen a membranas y otras macromoléculas en el espacio intracelular. La pared celular y la membrana plasmática que rodea la célula, así como las membranas de cloroplastos, actúan como una barrera que limita en gran medida la velocidad de transferencia de masa de carotenoides y otros compuestos intracelulares [11]. Además, como son compuestos sensibles a la luz, el oxígeno, compuestos ácidos y temperaturas elevadas [86], es de suma importancia la selección de métodos que permitan llevar a cabo su extracción sin dañar o alterar su composición final. Los métodos de extracción de compuestos como los carotenoides a partir de microalgas pueden clasificarse en convencionales y no convencionales, a continuación se describen algunos ejemplos de éstos métodos de extracción.

4.3.1. Convencionales

Las técnicas de extracción convencionales se basan en el uso de solventes orgánicos como el hexano, diclorometano, cloroformo, acetona, etanol, etc. La extracción Soxhlet es el tipo de extracción convencional más empleada para la extracción de carotenoides a partir de microalgas. Los métodos convencionales de extracción son considerados económicos y fáciles de escalar, pero debe considerarse que las extracciones se llevan a cabo en periodos largos de tiempo, requiere de tratamientos adicionales como la evaporación, se emplean grandes cantidades de disolventes que pueden llegar a ser perjudiciales para el medio ambiente si no son tratados debidamente [97] [109] [85] [110] [111].

4.3.2. No convencionales

Electrotecnologías

Las electrotecnologías son técnicas de extracción no térmicas y ecológicas, empleadas para la extracción de compuestos intracelulares a partir de plantas y biosuspensiones como en el caso de las microalgas. Dentro de las electrotecnologías se encuentran: el campo eléctrico pulsado (PEF, por sus siglas en inglés), campo eléctrico moderado (MEF, por sus siglas en inglés) y descarga eléctrica de alta tensión (HVED, por sus siglas en inglés). Si bien cada una de las tecnologías se opera de manera diferente, todas tienen la finalidad de inducir la desintegración celular mediante corriente eléctrica que permita la extracción selectiva de compuestos intracelulares [85].

Extracción con líquidos presurizados (PLE)

La extracción con líquidos presurizados (PLE, por sus siglas en inglés), se considera una técnica verde para la extracción de compuestos a partir de fuentes biológicas. La extracción con PLE utiliza solventes a temperatura y presión elevadas (en un rango de 50–200 °C y

35–200 bar). Las altas temperaturas aceleran la cinética de extracción, mientras que la alta presión mantiene al disolvente en estado líquido permitiendo así extracciones rápidas y seguras. Es considerado un método de extracción amigable con el medio ambiente debido a que se emplean procesos automatizados que permiten el uso de menos solvente y poco tiempo de extracción, además de que se pueden emplear solventes como el agua y el etanol [112] [85] [113].

El uso de la PLE para la extracción de carotenoides en microalgas ha sido limitado y reciente, pero es un método recomendable para la extracción de carotenoides sensibles a la luz y al oxígeno [114].

Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) se basa en la asistencia de la radiación electromagnética con frecuencias de 0.3 a 300 GHz, que inducen el calor dentro del material a través de la rotación dipolar y la conducción iónica de las moléculas. La activación de éstas moléculas y el calor generado en éste proceso pueden debilitar o romper las paredes celulares, por lo que los compuestos bioactivos pueden liberarse más fácilmente desde la matriz del material a los solventes de extracción. Se ha utilizado la MAE para obtener compuestos bioactivos como lípidos y pigmentos de microalgas de los géneros Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Eustigmatophyceae y Phaeophyceae [115] [116] [110] [2].

Extracción asistida con ultrasonido (UAE)

El principio de la técnica de extracción asistida con ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés) es la cavitación acústica para la formación de burbujas que implosionan las fuerzas de cizallamiento, lo que permite dar paso a la ruptura de la pared celular de manera que permite que el solvente penetre a la materia vegetal y como resultado de ésta ruptura celular aumenta el área de contacto entre el solvente y el compuesto de interés. Ésta técnica proporciona ventajas sobre las extracciones convencionales con solventes ya que mejora el rendimiento y la velocidad de extracción, requiere menor tiempo de extracción, temperaturas bajas y uso reducido de solvente, algo que resulta de suma importancia en la extracción de compuestos termolábiles como los carotenoides [110] [113] [114].

Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Un fluido supercrítico (SF, por sus siglas en inglés) es aquel fluido que se lleva a sus condiciones críticas de temperatura y presión (Figura 4.3), en éstas condiciones varias propiedades del fluido se posicionan entre las de un gas y un líquido. Un SF tiene una densidad similar a la de un líquido, su viscosidad es parecida a la de un gas y su difusividad se encuentra intermedia entre los dos estados [111] [117]. Las propiedades de un SF pueden observarse en la tabla 4.2.

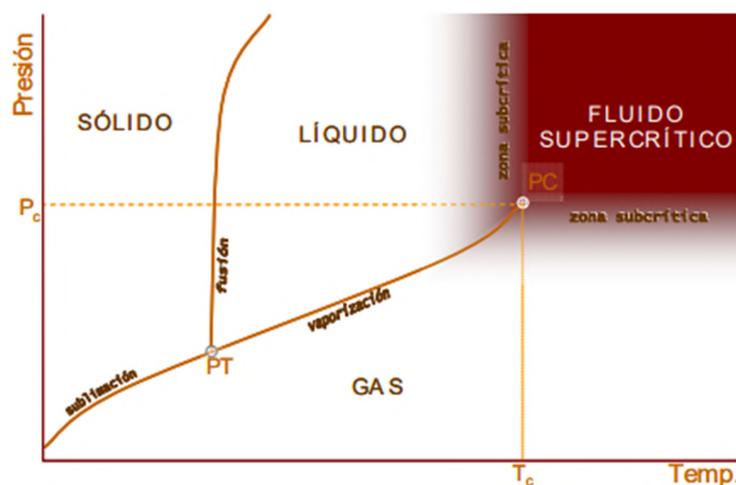


Figura 4.3: Diagrama de fases sólido/líquido/gas PT: punto triple, PC: punto crítico, P_c: presión crítica, T_c: temperatura crítica Tomada de: Mendiola et al. (2008) [118].

Tabla 4.2: Valores de varias propiedades fisicoquímicas de gases, líquidos y fluidos supercríticos Tomada de: Herrero et al. (2006) [111].

Estado del fluido	Densidad (ρ , g/cm ³)	Difusividad (D_{AB} , cm ² /s)	Viscosidad (μ , g/cm*s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Líquido	1	<10 ⁻⁵	10 ⁻²
Supercrítico	0.3-0.8	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ -10 ⁻³

Por lo anterior un SF tiene la ventaja de que su solubilidad puede modificarse en función al cambio de su temperatura y/o presión, lo que le permite ser empleado para extracciones de manera selectiva de diversos compuestos [111] [119] [120]. La extracción con fluidos supercríticos (SFE, por sus siglas en inglés) es el método no convencional más empleado para la extracción de carotenoides a partir de microalgas [85] [119].

Algunos solventes como el CO₂, el argón, la acetona, el agua, el etanol, etc., pueden ser empleados para la extracción de compuestos en condiciones supercríticas. Actualmente, el CO₂ es el solvente más empleado para las SFE por sus ventajas como: baja toxicidad, inflamabilidad, alta pureza, amigable con el medio ambiente, bajo precio, no corrosivo y puede alcanzar con facilidad las condiciones supercríticas [111] [121] [122] [118]. Sin embargo, también es posible agregar cosolventes como el metanol o el etanol para aumentar la extracción de compuestos polares [122] [85].

La extracción de compuestos usando SFE, consiste en una serie de pasos que se describen a continuación: **(a)** el sustrato sólido absorbe el solvente supercrítico y se promueve la expansión de las estructuras celulares del sustrato; **(b)** de manera simultánea, los compuestos

solubles son disueltos en el disolvente; **(c)** los compuestos disueltos se transfieren por difusión a la superficie sólida; y **(d)** son transportados por el solvente y removidos del extractor [122, 123].

El equipamiento de un sistema de SFE puede constituirse de la siguiente manera: **(1)** tanque de almacenamiento, se almacena el fluido empleado como solvente; **(2)** intercambiador de calor, el fluido se enfriará hasta alcanzar una temperatura que le permita pasar por la bomba; **(3)** bomba, que permite elevar la presión del fluido a una presión crítica; **(4)** intercambiador de calor, para calentar el fluido hasta una temperatura por encima de la crítica, alcanzándose las condiciones necesarias para la extracción; **(5)** celda de extracción, el fluido supercrítico pasa a través de la materia prima disolviendo y arrastrando las componentes de interés; **(6)** válvula, para disminuir la presión del SF; **(7)** intercambiador de calor, el fluido expandido se enfría por debajo de su temperatura crítica y pierde sus propiedades como solvente, lo que permite que los componentes extraídos puedan separarse fácilmente; **(8)** separador, se extrae el gas por la parte superior y el extracto por la parte inferior [124]. En la figura 4.4 se muestra un diagrama de un extractor con SFE con las características antes mencionadas.

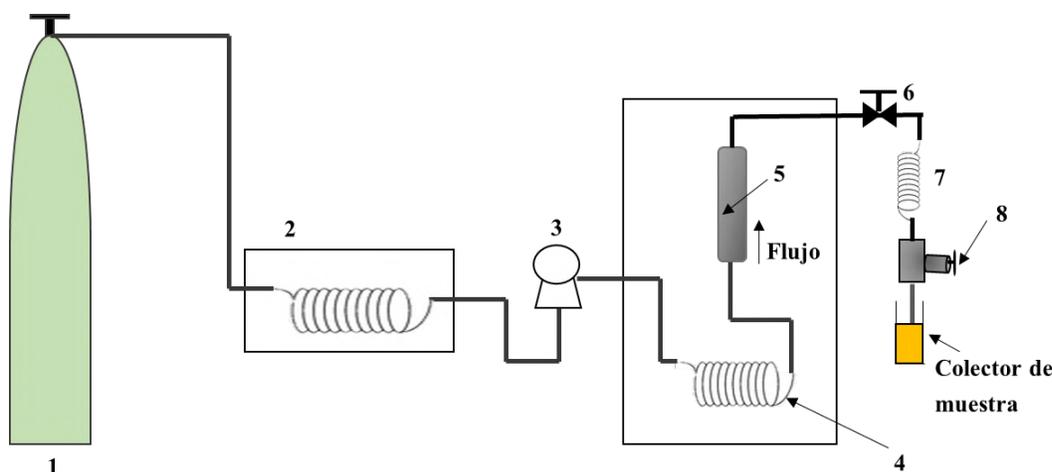


Figura 4.4: Esquema de un extractor de fluidos supercríticos. Elaboración propia con información de: Reglero et al. (2004) [124].

En la tabla 4.3 se presentan algunas de las ventajas y desventajas de las tecnologías de extracción de carotenoides ya mencionadas.

Tabla 4.3: Ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción de carotenoides.

Método de extracción	Ventajas	Desventajas
Soxhlet	Simple y convencional	Tiempos prolongados de extracción y gran cantidad de solvente
Electrotecnologías	Altos rendimientos de extracción y bajo uso de energía	Altos costos de instrumentación
Líquidos presurizados (PLE)	Rápido y uso de poco solvente	Difícil de aplicar a grandes volúmenes
Asistida por microondas (MAE)	Simple, rápido y económico	Degradación térmica y <i>cis – trans</i> isomerización de carotenoides
Asistida por ultrasonido (UAE)	Extracción rápida y eficiente	El rendimiento se ve afectado a medida del uso de la sonda ultrasónica
Fluidos supercríticos (SFE)	Extractos con alta pureza, rápido y eficiente	Altos costos de instrumentación, bajo rendimiento de extracción de carotenoides polares

4.4. Extracción de metabolitos de alto valor

4.4.1. Preparación de la biomasa

Después del proceso de secado, se recuperaron 34.5 g de biomasa en forma de hojuelas y debido a que la biomasa iba a pasar por un proceso de extracción de pigmentos era necesaria la reducción del tamaño de partícula de las muestras a utilizar. Por lo que la biomasa en forma de hojuelas se molió con la ayuda de un mortero y se pasó por un tamiz con número de malla 80 (Endecotts)(figura 4.5). Posterior al proceso de molienda y tamizado se recuperaron 30.41 g de biomasa con un tamaño de partícula menor a 0.177 mm.



(a) Molienda y tamizado de la biomasa. (b) Biomasa obtenida después de la molienda y tamizado.

Figura 4.5: Reducción de tamaño de las hojuelas de biomasa microalgal.

4.4.2. Extracción de carotenoides

Las extracciones se llevaron a cabo en la planta piloto del Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales. El equipo de extracción supercrítica fue diseñado por los profesores Carlos Ariel Cardona, Mario Franco y Andrés Goyes. En las figuras 4.6 y 4.7 se puede ver una fotografía del equipo de extracción supercrítica y un esquema del mismo respectivamente. Por cuestiones de seguridad la presión máxima alcanzada por el equipo es de 300 bares.

El equipo de extracción ha sido empleado con anterioridad para la obtención de extractos a partir de diversas materias primas como frutas, plantas aromáticas y flores (Cerón (2013)[125], Cerón (2009) [126] y Botero (2012) [127]) y hasta la fecha no había sido empleada para la obtención de extractos a partir de microalgas.



Figura 4.6: Equipo de extracción supercrítica.

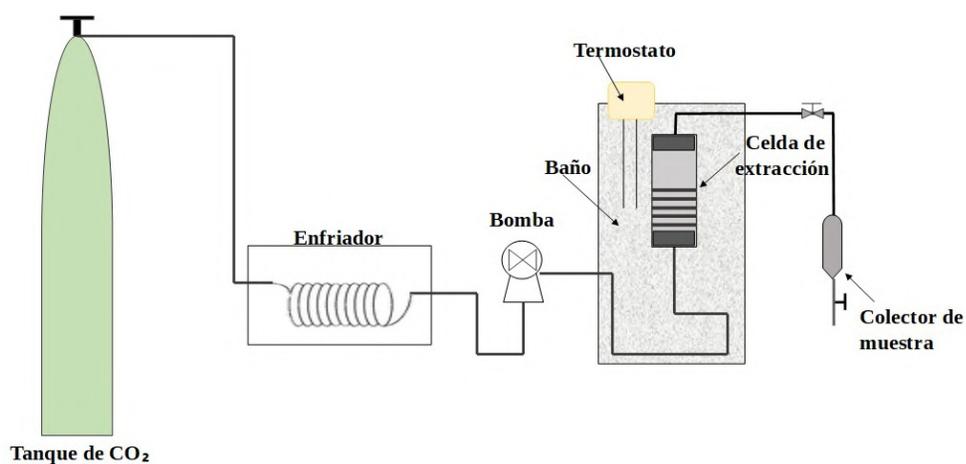


Figura 4.7: Esquema del equipo de extracción supercrítica.

Para el proceso de extracción con dióxido de carbono supercrítico, se emplearon muestras de etanol - microalga. Las muestras se prepararon de acuerdo con la relación 35/65 (p/p de microalga y solvente) propuesta por Ruen-ngam et al. (2012) [128]. Se pesaron 10 g de biomasa microalgal y 18.57 g de etanol absoluto (Carlo Erba), la biomasa microalgal se transfería a un dedal de tela de algodón como se observa en la figura 4.8.



Figura 4.8: Muestra empleada para la extracción con SFE.

Durante la preparación de las muestras se calentaba el baño de agua del equipo en el que se encontraba la celda de extracción a la temperatura correspondiente a cada experimento. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se introducía a la celda de extracción la muestra de biomasa microalgal y etanol y se cerraba cuidadosamente para evitar fugas, posteriormente se bombeaba el CO_2 hasta alcanzar la presión propuesta para cada experimento. Cada experimento tenía una duración de 60 minutos.

Transcurrido el tiempo de extracción el equipo se despresurizaba y se recuperaba el extracto del colector en frascos de vidrio color ámbar. El colector se limpiaba con etanol absoluto con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de extracto y se almacenaban a 4°C hasta su posterior análisis.

La temperatura de cada experimento varió de 40 , 50 y 60°C , y la presión varió de 200 y 300 bares. Al finalizar los experimentos se recuperó la biomasa microalgal remanente.

4.5. Análisis de los extractos

El análisis de los extractos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés). Se utilizó un cromatógrafo Ultimate 300 (Thermo Scientific) equipado con un detector UV/visible. El análisis se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Ruen-ngam et al.(2012) con algunas modificaciones [128]. Para la separación de los compuestos se empleó una columna Kinetex Evo C_{18} (50×4.6 mm de diámetro interno, $2.6 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula; Phenomenex). Se empleó como fase móvil metanol:THF ($90:10$ v/v). La velocidad del flujo fue de 0.4 mL min^{-1} , el volumen de inyección de $20 \mu\text{L}$, a 30°C durante 7 minutos. La detección de β -caroteno se llevó a cabo a 480 nm . Las señales fueron registradas mediante el software cromatográfico Chromeleon (Thermo Scientific). Todos los extractos se analizaron por duplicado. En el anexo II se pueden observar los diferentes cromatogramas obtenidos de los diferentes extractos analizados.

4.6. Resultados y discusión

Los rendimientos de β -caroteno en los extractos obtenidos y CO₂-etanol a diferentes presiones y temperaturas se representan en la figura 4.9.

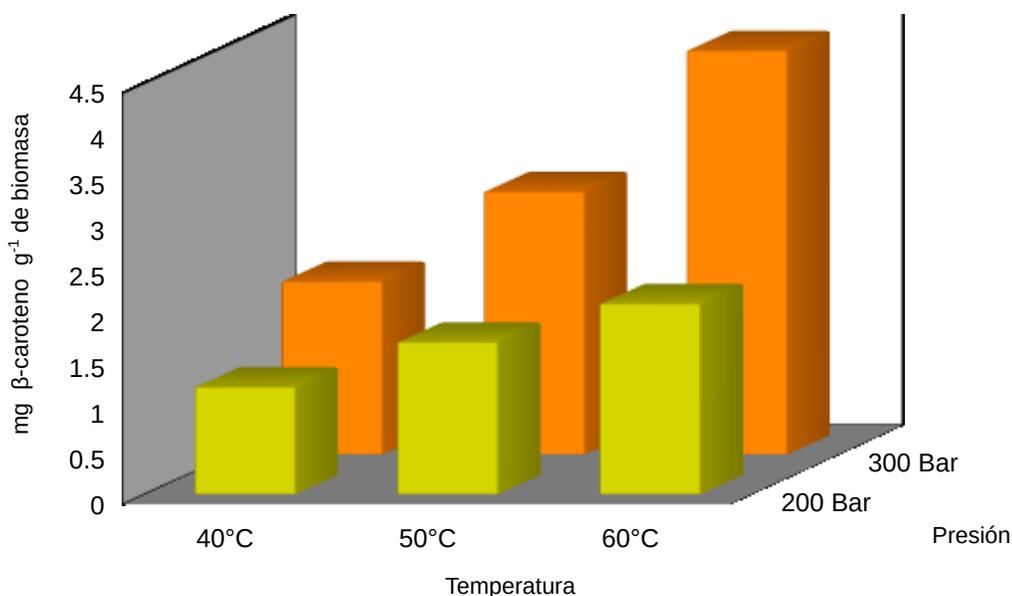


Figura 4.9: Rendimiento de extracción de β -caroteno con CO₂ supercrítico y etanol.

A 300 bar se aumenta la densidad del sistema (CO₂ + cosolvente) y se mejoran sus propiedades como solvente, dando como resultado variaciones en comparación con los resultados obtenidos a 200 bar. El aumento de la temperatura de hasta 60 °C provoca un aumento en los rendimientos de extracción de β -caroteno. Estos resultados sugieren que el β -caroteno se extrae en mayor proporción a 60 °C y 300 bares, obteniendo 4.42 ± 0.32 mg g⁻¹ de biomasa microalgal seca. Este valor es mayor a los valores reportados para otros trabajos con monocultivos en condiciones similares de extracción donde obtienen de entre 0.2 y 0.7 mg de β -caroteno g⁻¹ de biomasa microalgal seca [131]. El rango de carotenoides totales extraídos en condiciones similares va de 2.76 a 34.3 mg de carotenoides totales g⁻¹ de biomasa microalgal [129] [130] [128].

Esto coincide con lo reportado por Cardoso et al. (2012) para la extracción de carotenos de biomasa microalgal, donde la concentración de β -caroteno obtenida por cada gramo de biomasa seca es mayor a 300 bar que a 200 bar cuando la temperatura de extracción es de 60 °C [131].

La biomasa microalgal usada para las extracciones era renovada únicamente cuando se variaban las condiciones de presión propuestas (200 y 300 bar) para las extracciones, y no para cuando se hacían cambios en la temperaturas. En la figura 4.10 se puede observar el rendimiento de extracción global de β -caroteno, obtenida a partir de la suma de β -caroteno obtenido en cada extracción. Y los resultados se representan de acuerdo a las dos condiciones de extracción propuestas. Como se puede observar, la mayor concentración de β -caroteno se obtuvo cuando la presión era mayor (300 bar), lo que demuestra que para las condiciones propuestas de extracción a mayor presión se mejoran las propiedades como solvente del sistema (CO_2 + cosolvente).

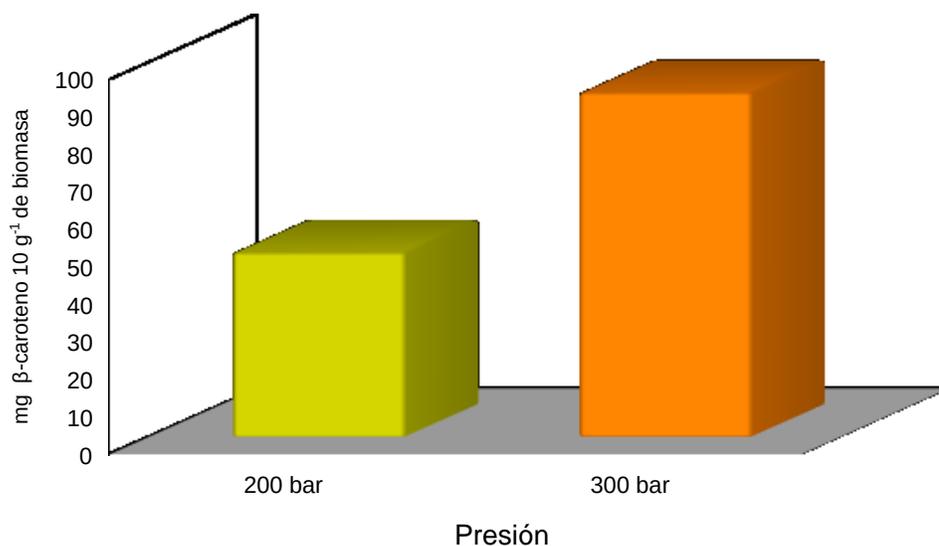


Figura 4.10: Rendimiento global de extracción de β -caroteno con CO_2 supercrítico y etanol.

El β -caroteno fue el único carotenoide identificado debido a los estándares grado HPLC con los que se contaba. Sin embargo de acuerdo a lo observado en los cromatogramas (Anexo II) y a lo reportado por Kitada et al.(2009) y Ruen-ngam et al. (2012) otro caroteno de interés que podría estar presente en los extractos es la luteína [128]. El método de extracción de carotenoides permitió la recuperación de 9 g de biomasa, esto representa la pérdida de 1 g de biomasa debido a la adhesión de biomasa al dedal de tela empleado para la extracción.

En la figura 4.11 se observa una imagen comparativa del antes y el después de las extracciones de la biomasa microalgal.



Figura 4.11: Biomasa microalgal antes y después del proceso de extracción a las condiciones de presión y temperatura propuestas.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede ver que para cada temperatura los rendimientos de extracción aumentan con la presión. Este comportamiento puede atribuirse al aumento en la densidad del sistema (CO_2 + cosolvente) con la presión a las temperaturas de operación propuestas, lo que provoca que la difusividad del sistema sea más alta. Se puede observar el mismo comportamiento cuando se analiza el efecto de la temperatura. Para cada presión, el aumento en la temperatura produce un aumento en los rendimientos de extracción de β -caroteno.

Conclusiones y Perspectivas

5.0.1. Conclusiones

Uno de los objetivos principales de este proyecto era evaluar el crecimiento de un cultivo mixto microalgal en fotobiorreactores de placa plana con fertilizante agrícola foliar como medio de cultivo. Mediante la construcción de la cabina de cultivo con fotoperiodos se logró aumentar la capacidad de producción de biomasa microalgal dentro del laboratorio de Bioenergía del IER-UNAM.

El inicio del cultivo en la CCFP estuvo marcado por un decaimiento en la concentración de biomasa que fue solventado por un proceso de reinoculación al día cinco. A partir de ese momento y hasta el día catorce que se siguió el cultivo se logró la acumulación de biomasa y de pigmentos como clorofila y carotenoides. Sin embargo, la acumulación de los pigmentos no estuvo correlacionada con el aumento de la concentración celular.

Al determinar el consumo de nutrientes, se notó que de las formas de nitrógeno presentes en fertilizante agrícola foliar empleado como medio de cultivo, sólo se consume el 12 % del amonio. Por otro lado, se consume el 41 % de los fosfatos. Esto implica que las microalgas no están aprovechando el total de las fuentes de nitrógeno y fósforo del fertilizante agrícola foliar, por lo que su uso implica el desperdicio de los mismos, además de que estos representan una fuente de contaminación al momento de la descarga de los residuos.

El uso de CO₂ supercrítico y etanol como cosolvente permitió la extracción de carotenoides. El rendimiento global de extracciones sucesivas a 300 bar con diferentes temperaturas fue mejor comparado con el rendimiento a 200 bar. El aumento de la temperatura del proceso mejoró los rendimientos de extracción de carotenoides tanto a 200 bar como a 300 bar. Mediante el análisis del extracto con HPLC, se determinó un rendimiento de 4.42 mg de β -caroteno g⁻¹ de biomasa microalgal seca a 300 bar y 60 °C. El rendimiento de β -caroteno alcanzado es mayor a los reportados para otras microalgas en condiciones similares de extracción.

5.0.2. Perspectivas

Dado que el crecimiento de microalgas depende de muchos factores como la temperatura, intensidad de luz, contenido de nutrientes, fuentes de carbono, salinidad, pH, entre otros, el uso de un cultivo mixto vuelve más complejo el control de parámetros y el análisis de su efecto debido a que cada parámetro actúa de manera diferente sobre las especies de microalgas presentes en el cultivo. Es importante llevar a cabo la purificación de las especies presentes en el cultivo mixto de manera que permita entender su comportamiento ante el cambio o modificación de los diferentes factores antes mencionados. Por otro lado, el estudio de una cepa pura reportada como productora de carotenoides facilitará el entendimiento de los efectos de la variación de los diferentes parámetros que afectan el metabolismo de las microalgas.

Como una alternativa al medio de cultivo empleado en este trabajo, se propone la formulación de un medio de cultivo con sales de amonio y fosfatos en concentraciones adecuadas que permitan el consumo eficiente de los nutrientes y evitar que al momento de la descarga sean una fuente de contaminación.

Se propone la caracterización de la biomasa resultante de los procesos de extracción de carotenoides, además de su valorización mediante su aprovechamiento en procesos de producción de biocombustibles como el biogás y la cogeneración de energía. Esto, con el fin de proponer un esquema de biorrefinación dentro de un proceso de economía circular amigable con el ambiente.

Referencias

- [1] International Energy Agency. Energy policies beyond iea contries, 2017, 2017.
- [2] Secretaria de Energia. Balance nacional de energia, 2000, 2001.
- [3] Vijai Kumar Gupta and Maria G Tuohy. Biofuel technologies. *Recent Developments. Editorial Springer*, 2013.
- [4] Historical Data Workbook. Bp statistical review of world energy:[6]. 2014.
- [5] Srikanth Reddy Medipally, Fatimah Md Yusoff, Sanjoy Banerjee, and M Shariff. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *BioMed research international*, 2015, 2015.
- [6] Peter McKendry. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bio-resource technology*, 83(1):37–46, 2002.
- [7] Devendra Deshmukh and RV Ravikrishna. Experimental studies on high-pressure spray structure of biofuels. *Atomization and Sprays*, 21(6), 2011.
- [8] Luis Carlos Fernández-Linares, Jorge Montiel-Montoya, Aarón Millán-Oropeza, and Jesús Agustín Badillo-Corona. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3b):101–115, 2012.
- [9] Manoj Kumar Enamala, Swapnika Enamala, Murthy Chavali, Jagadish Donepudi, Rajasri Yadavalli, Bhulakshmi Kolapalli, Tirumala Vasu Aradhyula, Jeevitha Velpuri, and Chandrasekhar Kuppam. Production of biofuels from microalgae-a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94:49–68, 2018.
- [10] Laura Barsanti and Paolo Gualtieri. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal research*, 31:107–115, 2018.
- [11] Carlos Vilchez, Eduardo Forján, María Cuaresma, Francisco Bédmar, Inés Garbayo, and José M Vega. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine drugs*, 9(3):319–333, 2011.

-
- [12] Juan Luis Ramos Suárez. *Producción de biogás a partir de biomasa de la microalga *scenedesmus* sp. procedente de diferentes procesos*. PhD thesis, Universidad Politécnica de Madrid, 2014.
- [13] Matteo De Besi and Kes McCormick. Towards a bioeconomy in europe: National, regional and industrial strategies. *Sustainability*, 7(8):10461–10478, 2015.
- [14] Kes McCormick and Niina Kautto. The bioeconomy in europe: An overview. *Sustainability*, 5(6):2589–2608, 2013.
- [15] Hans Langeveld, Johan Sanders, and Marieke Meeusen. *The biobased economy: Biofuels, materials and chemicals in the post-oil era*. Routledge, 2012.
- [16] Adrián G Rodríguez. La bioeconomía: oportunidades y desafíos para el desarrollo rural, agrícola y agroindustrial en américa latina y el caribe. 2017.
- [17] Ángel-Darío González-Delgado and Viatcheslav Kafarov. Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4(4):5–22, 2011.
- [18] Francesco Cherubini, Gerfried Jungmeier, Michael Mandl, Connie Philips, Maria Wellisch, Henning Jrgensen, Ioannis Skiadas, Leonard Boniface, Maurice Dohy, Jean-Cristophe Pouet, et al. Iea bioenergy task 42 on biorefineries: Co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass. In *IEA bioenergy task*, pages 1–37, 2007.
- [19] Andrea Teresa Espinoza Pérez, Mauricio Camargo, Paulo César Narváez Rincón, and Miguel Alfaro Marchant. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: a bibliographic analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69:350–359, 2017.
- [20] Bala Kiran, Ritunesh Kumar, and Devendra Deshmukh. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy conversion and management*, 88: 1228–1244, 2014.
- [21] Magdalena Frac, Stefania Jezierska-Tys, and Jerzy Tys. Microalgae for biofuels production and environmental applications: A review. *African Journal of Biotechnology*, 9(54):9227–9236, 2010.
- [22] Qiang Hu, Milton Sommerfeld, Eric Jarvis, Maria Ghirardi, Matthew Posewitz, Michael Seibert, and Al Darzins. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4):621–639, 2008.
- [23] Kit Wayne Chew, Jing Ying Yap, Pau Loke Show, Ng Hui Suan, Joon Ching Juan, Tau Chuan Ling, Duu-Jong Lee, and Jo-Shu Chang. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology*, 229:53–62, 2017.
- [24] Martina D’Este, Irini Angelidaki, and Merlin Alvarado-Morales. Algal biomass for bioenergy and bioproducts production in biorefinery concepts. 2017.
-

-
- [25] Pauline Spolaore, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, and Arsène Isambert. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2):87–96, 2006.
- [26] Wolfgang Becker. 18 microalgae in human and animal nutrition. In *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, volume 312. Wiley Online Library, 2004.
- [27] SK Ratha and R Prasanna. Bioprospecting microalgae as potential sources of “green energy”—challenges and perspectives. *Applied biochemistry and microbiology*, 48(2):109–125, 2012.
- [28] Otto Pulz and Wolfgang Gross. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6):635–648, 2004.
- [29] Liam Brennan and Philip Owende. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2):557–577, 2010.
- [30] Alexis Hernández-Pérez and José I Labbé. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2):157–173, 2014.
- [31] Amos Richmond et al. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, volume 577. Wiley Online Library, 2004.
- [32] Apurav Krishna Koyande, Kit Wayne Chew, Krishnamoorthy Rambabu, Yang Tao, Dinh-Toi Chu, and Pau-Loke Show. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 2019.
- [33] Georgios Panis and J Rosales Carreon. Commercial astaxanthin production derived by green alga haematococcus pluvialis: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18:175–190, 2016.
- [34] Kim Johanna Maria Mulders. *Phototrophic pigment production with microalgae*. Wageningen University, 2014.
- [35] Alejandra Sánchez-Bayo Álvarez et al. Biorrefinería de microalgas para la producción de biocombustibles. 2019.
- [36] SR Sruthi, D Ramar, and S Pitchai. The application of microalgae an impending bio-fertilizer: Maize cultivation as a model. In *Proceedings of International Forestry and Environment Symposium*, volume 21, 2016.
- [37] R Dineshkumar, R Kumaravel, J Gopalsamy, Mohammad Nurul Azim Sikder, and P Sampathkumar. Microalgae as bio-fertilizers for rice growth and seed yield productivity. *Waste and biomass valorization*, 9(5):793–800, 2018.
-

-
- [38] Archana Tiwari and Thomas Kiran. Biofuels from microalgae. *Advances in Biofuels and Bioenergy*, page 239, 2018.
- [39] Jassinnee Milano, Hwai Chyuan Ong, HH Masjuki, WT Chong, Man Kee Lam, Ping Kwan Loh, and Viknes Vellayan. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58:180–197, 2016.
- [40] Balasubramani Ravindran, Sanjay Gupta, Won-Mo Cho, Jung Kim, Sang Lee, Kwang-Hwa Jeong, Dong Lee, and Hee-Chul Choi. Microalgae potential and multiple roles—current progress and future prospects—an overview. *Sustainability*, 8(12):1215, 2016.
- [41] Jorge Alberto Vieira Costa and Michele Greque de Moraes. An open pond system for microalgal cultivation. In *Biofuels from Algae*, pages 1–22. Elsevier, 2014.
- [42] D Karthikeyan, M Muthukumaran, and BS Balakumar. Mass cultivation of microalgae in open raceway pond for biomass and biochemicals production. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(2):247–260, 2016.
- [43] Steven J Burgess, Bojan Tamburic, Fessehaye Zemichael, Klaus Hellgardt, and Peter J Nixon. Solar-driven hydrogen production in green algae. In *Advances in applied microbiology*, volume 75, pages 71–110. Elsevier, 2011.
- [44] CU Ugwu, Hi Aoyagi, and H Uchiyama. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99(10):4021–4028, 2008.
- [45] AST Ingeniería S.L. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. 312, 2013.
- [46] Roberto Bustos Pariente. *Producción y cosechado de biomasa de microalgas para su aprovechamiento industrial*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, 2016.
- [47] Michael Turner. Microalgae—biotechnology and microbiology: Ew becker, cambridge studies in biotechnology (sir j. baddiley, nh carey, ij higgins & wg potter, editors), no. 10; cambridge university press, cambridge; 1994; 293 pp.; gbp 40.00, us \$69.95; isbn 0-521-35020-4, 1994.
- [48] Bingtao Zhao and Yaxin Su. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31:121–132, 2014.
- [49] Harizah Bajunaid Hariz and Mohd Sobri Takriff. Growth and biomass production of native microalgae chlorella sp., chlamydomonas sp. and scenedesmus sp. cultivated in palm oil mill effluent (pome) at different cultivation conditions. *Transactions on Science and Technology*, 4(3-2):298–311, 2017.
-

-
- [50] Se-Kwon Kim and Katarzyna Chojnacka. *Marine algae extracts: processes, products, and applications*. John Wiley & Sons, 2015.
- [51] GuanHua Huang, Feng Chen, Dong Wei, XueWu Zhang, and Gu Chen. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied energy*, 87(1):38–46, 2010.
- [52] N Takemura, T Iwkume, and M Rusuno. Photosynthesis and primary production of microcystis agruginosa in lake kasumigaura. *Journal of Plankton Research*, 7(3):303–312, 1985.
- [53] Lavajoo Fatemeh and Dehghani Mohsen. Effects of environmental factors on the growth, optical density and biomass of the green algae chlorella vulgaris in outdoor conditions. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 20(1):133–139, 2016.
- [54] Santhanam Perumal, AR Thirunavukkarasu, and Perumal Pachiappan. *Advances in marine and brackishwater aquaculture*. Springer, 2015.
- [55] Ibrahim Dincer, Can Ozgur Colpan, and Onder Kizilkan. *Exergetic, Energetic and Environmental Dimensions*. Academic Press, 2017.
- [56] M Zhu, X-C Zhang, and Y-X Mao. Effects of tempearture, salinity and illumination on the growth of thalassiosira sp. *Marine Sciences-Qingdao-Chinese Edition-*, 27(12): 61–69, 2003.
- [57] Martinus Jakobus Sonnekus. *Effects of salinity on the growth and lipid production of ten species of microalgae from the Swartkops Saltworks: A biodiesel perspective*. PhD thesis, 2010.
- [58] JBK Park, RJ Craggs, and AN Shilton. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1):35–42, 2011.
- [59] Ankita Juneja, Ruben Ceballos, and Ganti Murthy. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9):4607–4638, 2013.
- [60] Jiri Masojidek, Michal Koblizek, and Giuseppe Torzillo. Photosynthesis in microalgae. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, page 20, 2004.
- [61] Rafael Garcia Cubero. *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂*. PhD thesis, Universidad de Sevilla, 2014.
- [62] Ana P Carvalho, Susana O Silva, José M Baptista, and F Xavier Malcata. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5):1275–1288, 2011.
-

-
- [63] Matthew Forrest Blair, Bahareh Kokabian, and Veera Gnanaswar Gude. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1):665–674, 2014.
- [64] Bertha Olivia Arredondo Vega and Domenico Voltolina Lobina. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 2017.
- [65] RJ Porra, WA Thompson, and PE Kriedemann. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975(3):384–394, 1989.
- [66] Hartmut K Lichtenthaler and Alan R Wellburn. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, 1983.
- [67] HACH Manual de análisis De agua. Segunda edición en español. *HACH Company, Loveland, Colorado, EEUU*, pages 140–147, 2000.
- [68] Hach Company. *Hach water analysis handbook*. Hach Company, 1992.
- [69] E Wolfgang Becker. *Microalgae: biotechnology and microbiology*, volume 10. Cambridge University Press, 1994.
- [70] Hugh L MacIntyre and John J Cullen. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. *Algal culturing techniques*, pages 287–326, 2005.
- [71] Lin Lu, Guanpin Yang, Baohua Zhu, and Kehou Pan. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. 2017.
- [72] Veronica da Silva Ferreira and Celso Sant’Anna. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1):20, 2017.
- [73] Kehong Liang, Qinghua Zhang, Ming Gu, and Wei Cong. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 25(1): 311–318, 2013.
- [74] MA Hejazi, E Holwerda, and RH Wijffels. Milking microalga *Dunaliella salina* for β -carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(5): 475–481, 2004.
- [75] Alfredo Walter, Júlio Cesar de Carvalho, Vanete Thomaz Soccol, Ana Bárbara Bisinella de Faria, Vanessa Ghiggi, and Carlos Ricardo Soccol. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4):675–682, 2011.
-

-
- [76] Karin Larsson. Wastewater treatment with microalgae—a literature review. *Vatten*, 62(1):31, 2006.
- [77] Devaki Bhaya, Rakefet Schwarz, and Arthur R Grossman. Molecular responses to environmental stress. In *The ecology of cyanobacteria*, pages 397–442. Springer, 2000.
- [78] Enrique Valenzuela-Espinoza, Fabiola Lafarga-De-La-Cruz, Roberto Millán-Núñez, and Filiberto Núñez-Cebrero. Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31(1A):79–89, 2005.
- [79] P.J. Syrett. Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, 210:182–210, 1981.
- [80] J.J. McCarthy. The kinetics of nutrient utilization. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, 210:211–233, 1981.
- [81] Sergio O Lourenço, Ursula M Lanfer Marquez, Jorge Mancini-Filho, Elisabete Barbarino, and Elizabeth Aidar. Changes in biochemical profile of *tetraselmis gracilis* i. comparison of two culture media. *Aquaculture*, 148(2-3):153–168, 1997.
- [82] Michael W Lomas and Patricia M Glibert. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Phycology*, 36(5):903–913, 2000.
- [83] Ayhan Demirbas. Use of algae as biofuel sources. *Energy conversion and management*, 51(12):2738–2749, 2010.
- [84] F.G. Acien, J.M. Fernández, J.J. Magán, and E. Molina. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology advances*, 30(6):1344–1353, 2012.
- [85] Mahesha Poojary, Francisco Barba, Bahar Aliakbarian, Francesco Donsì, Gianpiero Pataro, Daniel Dias, and Pablo Juliano. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine drugs*, 14(11):214, 2016.
- [86] Ximena Lemus Villafuerte. *Obtención de carotenoides con la microalga Scenedesmus incrassatulus en un biorreactor tipo airlift*. PhD thesis, Instituto Politécnico Nacional, 2009.
- [87] R. Todd Lorenz and Gerald R Cysewski. Commercial potential for haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*, 18(4):160–167, 2000.
- [88] Michael A Borowitzka, John Beardall, John A Raven, et al. *The physiology of microalgae*, volume 6. Springer, 2016.
-

-
- [89] Marco Antonio Cruz Jimenez. Cultivo masivo de la microalga haematococcus sp. en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés. 2017.
- [90] Eon-Seon Jin, Juergen EW Polle, Hong-Kum Lee, Sang-Min Hyun, and Man Chang. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(2):165–174, 2003.
- [91] Francisco Delgado-Vargas, AR Jiménez, and O Paredes-López. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3):173–289, 2000.
- [92] C Juan, Bernardo Oyarzún, Nathalie Quezada, and José M del Valle. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, 247(1-2):90–95, 2006.
- [93] Merichel Plaza, Miguel Herrero, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibanez. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16):7159–7170, 2009.
- [94] H Hanaa Abd El Baky and GS El-Baroty. Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *J. Aquat. Sci*, 1(1):11–23, 2013.
- [95] Ana Catarina Guedes, Helena M Amaro, and Francisco Xavier Malcata. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4):625–644, 2011.
- [96] Nour-Eddine Rmiki, Yves Lemoine, and B Schoeff. Carotenoids and stress in higher plants and algae. *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker, pages 465–482, 1999.
- [97] Amritpreet K Minhas, Peter Hodgson, Colin J Barrow, and Alok Adholeya. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7:546, 2016.
- [98] Vitalia Henríquez, Carolina Escobar, Janeth Galarza, and Javier Gimpel. Carotenoids in microalgae. In *Carotenoids in Nature*, pages 219–237. Springer, 2016.
- [99] Erick J Vandamme and José Luis Revuelta. *Industrial biotechnology of vitamins, bio-pigments, and antioxidants*. John Wiley & Sons, 2016.
- [100] Martin Koller, Alexander Muhr, and Gerhart Braunegg. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal research*, 6:52–63, 2014.
- [101] Efterpi Christaki, Eleftherios Bonos, Ilias Giannenas, and Panagiota Florou-Paneri. Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1):5–11, 2013.
-

-
- [102] Cindy Mayorga, Enrique Murillo, and Leopoldo Manso. Luteína y b-caroteno como principales antioxidantes acumulados en la microalga *dunaliella* salina. *Revista Prisma Tecnológico*, 8(1):34–38, 2017.
- [103] Gatamaneni Loganathan Bhalamurugan, Orsat Valerie, and Lefsrud Mark. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, 23(3):229–241, 2018.
- [104] Luisa Gouveia and José Empis. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2):227–233, 2003.
- [105] Laurent Dufossé, Patrick Galaup, Anina Yaron, Shoshana Malis Arad, Philippe Blanc, Kotamballi N Chidambara Murthy, and Gokare A Ravishankar. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9):389–406, 2005.
- [106] José A Del Campo, Mercedes García-González, and Miguel G Guerrero. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6):1163–1174, 2007.
- [107] Ranga Rao Ambati, Deepika Gogisetty, Ravishankar Gokare Aswathanarayana, Sarada Ravi, Panduranga Narasimharao Bikkina, Lei Bo, and Su Yuepeng. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(12):1880–1902, 2019.
- [108] Margaret Caswell and David Zilberman. *Algoculture*. 2001.
- [109] Ronald Halim, Michael K Danquah, and Paul A Webley. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology advances*, 30(3):709–732, 2012.
- [110] Mengyue Gong and Amarjeet Bassi. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8):1396–1412, 2016.
- [111] Miguel Herrero, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food chemistry*, 98(1):136–148, 2006.
- [112] Kwang Hyun Cha, Hee Ju Lee, Song Yi Koo, Dae-Geun Song, Dong-Un Lee, and Cheol-Ho Pan. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2):793–797, 2009.
- [113] Laura Jaime, Irene Rodríguez-Meizoso, Alejandro Cifuentes, Susana Santoyo, Sonia Suarez, Elena Ibañez, and Francisco Javier Señorans. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoid extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1):105–112, 2010.
-

-
- [114] Judith R Denery, Klaus Dragull, CS Tang, and Qing X Li. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *haematococcus pluvialis* and *dunaliella salina* and kavalactones from *piper methysticum*. *Analytica chimica acta*, 501(2):175–181, 2004.
- [115] Rahul Kapoore, Thomas Butler, Jagroop Pandhal, and Seetharaman Vaidyanathan. Microwave-assisted extraction for microalgae: from biofuels to biorefinery. *Biology*, 7(1):18, 2018.
- [116] Hoang V Chuyen, Minh H Nguyen, Paul D Roach, John B Golding, and Sophie E Parks. Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food science & nutrition*, 6(1):189–196, 2018.
- [117] Mark McHugh and Val Krukonis. *Supercritical fluid extraction: principles and practice*. Elsevier, 2013.
- [118] Jose Antonio Mendiola León. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. 2008.
- [119] Siti Machmudah, Wahyu Diono, Hideki Kanda, and Motonobu Goto. Supercritical fluids extraction of valuable compounds from algae: Future perspectives and challenges. *Engineering Journal*, 22(5):13–30, 2018.
- [120] Ernesto Reverchon and Iolanda De Marco. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2):146–166, 2006.
- [121] Ma Dolores Macías-Sánchez, Casimiro Mantell Serrano, Miguel Rodríguez Rodríguez, Enrique Martínez de la Ossa, Luís M Lubián, and Olimpio Montero. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. *Journal of separation science*, 31(8):1352–1362, 2008.
- [122] Diego A Esquivel-Hernández, Ingrid P Ibarra-Garza, José Rodríguez-Rodríguez, Sara P Cuéllar-Bermúdez, Magdalena de J Rostro-Alanis, Gibrán S Alemán-Nava, J Saúl García-Pérez, and Roberto Parra-Saldívar. Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11(1):215–231, 2017.
- [123] OG Bhusnure, SB Gholve, PS Giram, VS Borsure, PP Jadhav, VV Satpute, and JN Sangshetti. Importance of supercritical fluid extraction techniques in pharmaceutical industry: A review. *IAJPR*, 5(12):3785–3801, 2015.
- [124] Guillermo Reglero, F Javier Sen, et al. Supercritical fluid extraction: an alternative to isolating natural food preservatives. In *Novel food processing technologies*, pages 561–576. CRC Press, 2004.
-

-
- [125] Ivonne Ximena Cerón Salazar et al. *Design and Evaluation of Processes to Obtain Antioxidant-Rich Extracts from tropical fruits cultivated in Amazon, Caldas and Northern Tolima Regions*. PhD thesis, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales, 2013.
- [126] Ivonne Ximena Cerón Salazar et al. *Separación de metabolitos de los aceites esenciales de eucalipto y cidrón por destilación molecular*. PhD thesis, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales, 2009.
- [127] J Moncada Botero. Design and evaluation of sustainable biorefineries from feedstocks in tropical regions. *Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ingeniería Química. Master Thesis*, 2012.
- [128] Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk, Prasert Pavasant, Siti Machmudah, and Motonobu Goto. Selective extraction of lutein from alcohol treated chlorella vulgaris by supercritical co₂. *Chemical Engineering & Technology*, 35(2):255–260, 2012.
- [129] MD Macías-Sánchez, C Mantell, de la Rodriguez, M, E Martínez de la Ossa, LM Lubián, and O Montero. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from dunaliella salina. *Talanta*, 77(3):948–952, 2009.
- [130] Kiwa Kitada, Siti Machmudah, Mitsuru Sasaki, Motonobu Goto, Yuya Nakashima, Shoichiro Kumamoto, and Takashi Hasegawa. Supercritical co₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from chlorella vulgaris. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(5):657–661, 2009.
- [131] Lourdes Casas Cardoso, Casimiro Mantell Serrano, Miguel Rodríguez Rodríguez, Enrique J Martínez de la Ossa, and Luis M Lubián. Extraction of carotenoids and fatty acids from microalgae using supercritical technology. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3(12A):877, 2012.
-

Anexos

Anexo I

Fotobiorreactor de placa plana

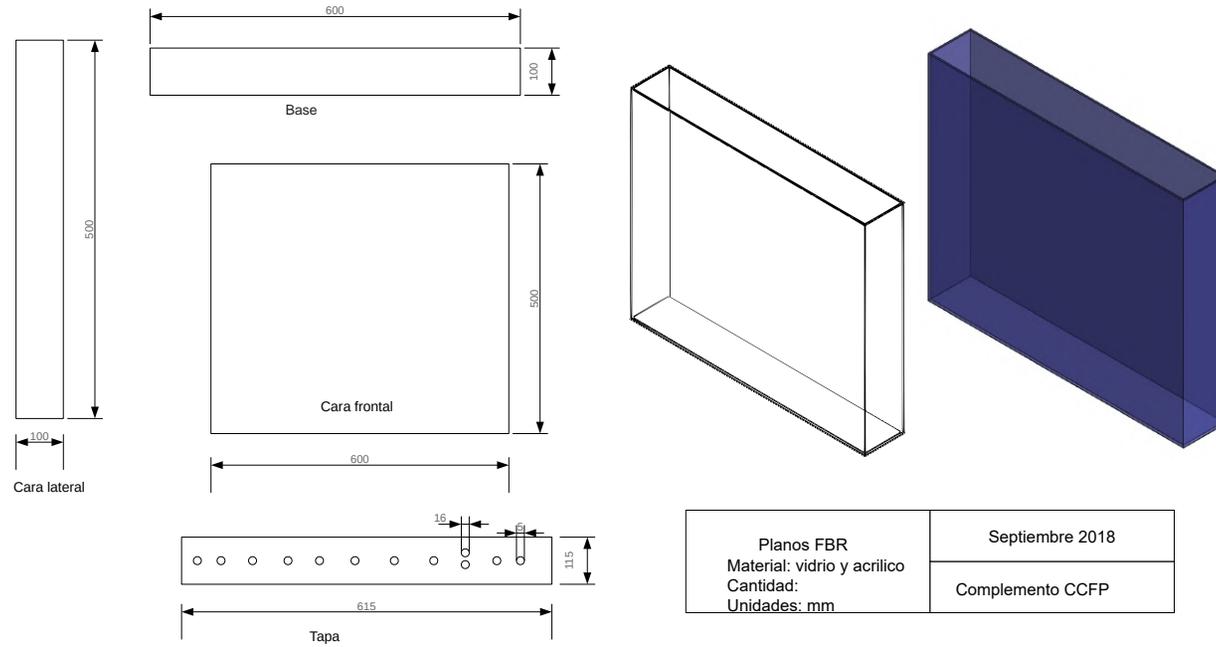


Figura 1: Planos del fotobiorreactor de placa plana.

Cabina de cultivo con fotoperiodos y complementos

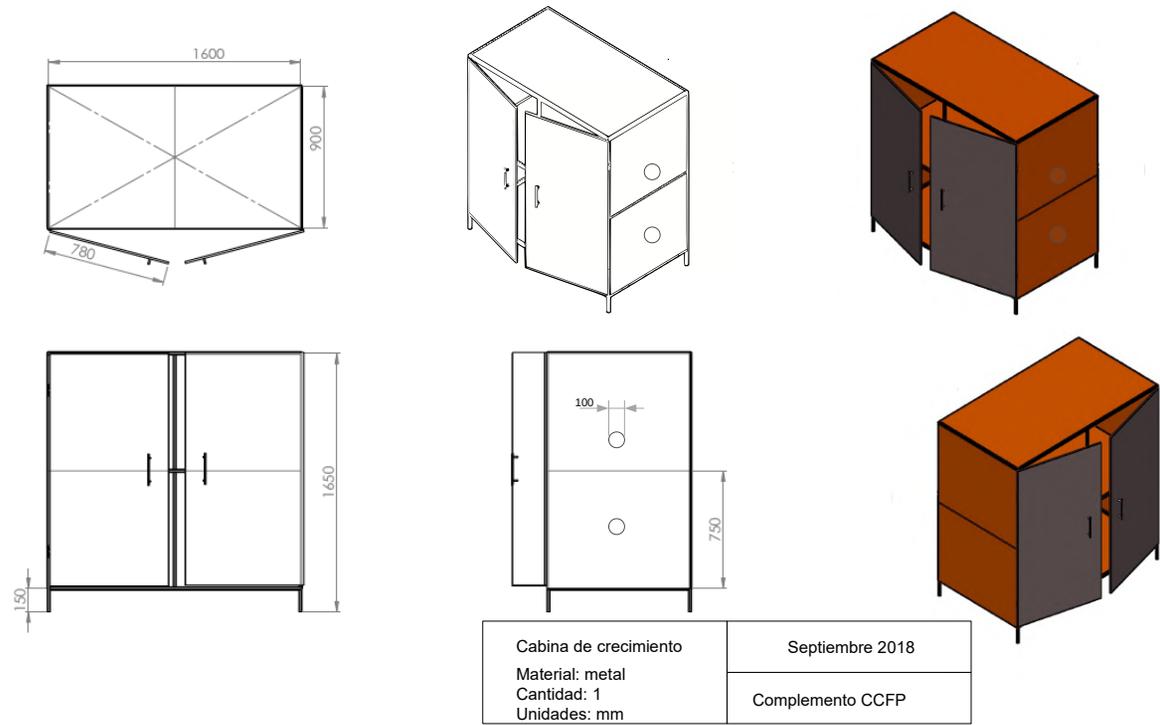


Figura 2: Planos cabina de cultivo con fotoperiodos.

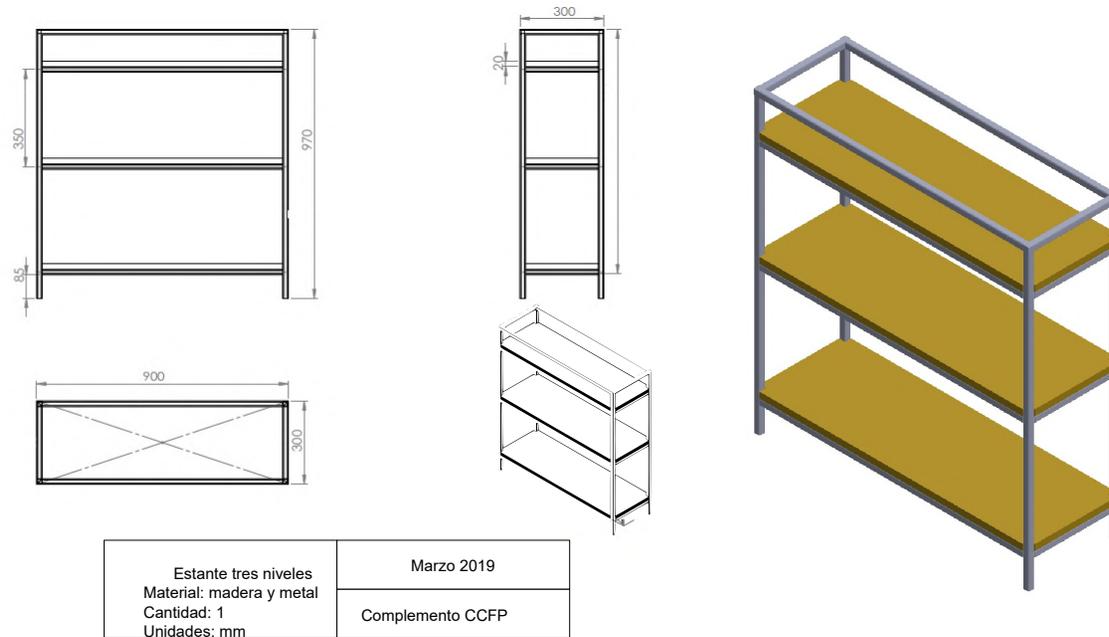


Figura 3: Planos estante de tres niveles.

Cromatogramas

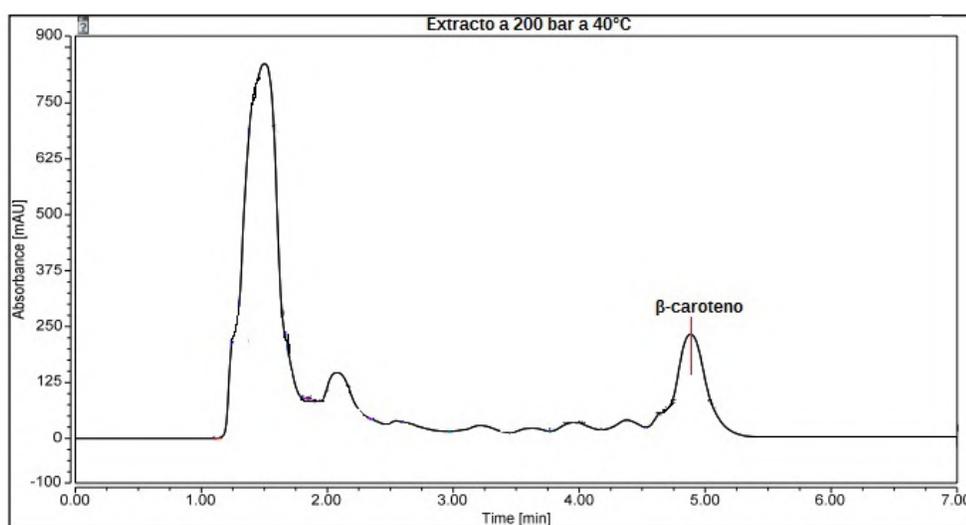


Figura 4: Cromatograma del extracto obtenido a 200 bar y 40 °C.

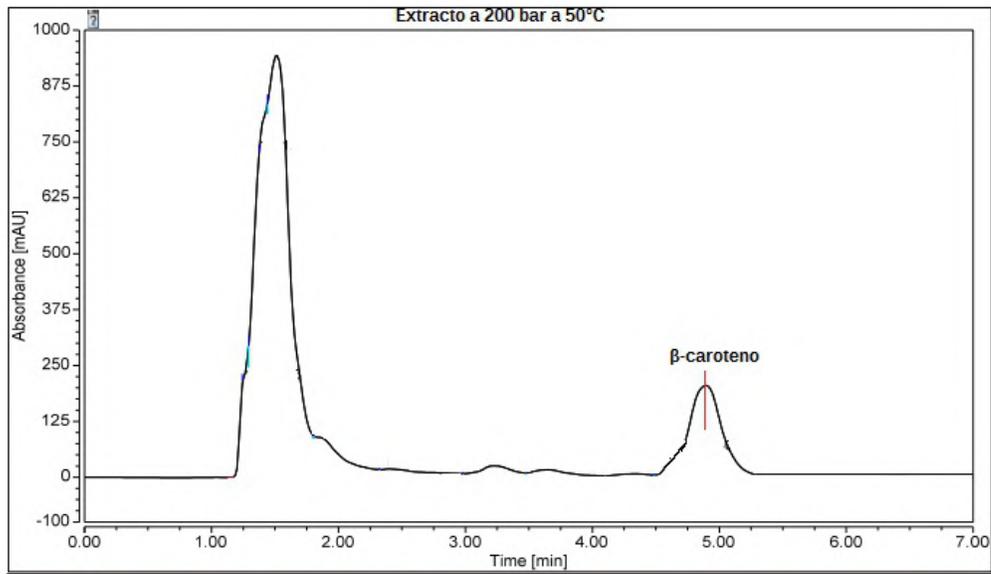


Figura 5: Cromatograma del extracto obtenido a 200 bar y 50 °C.

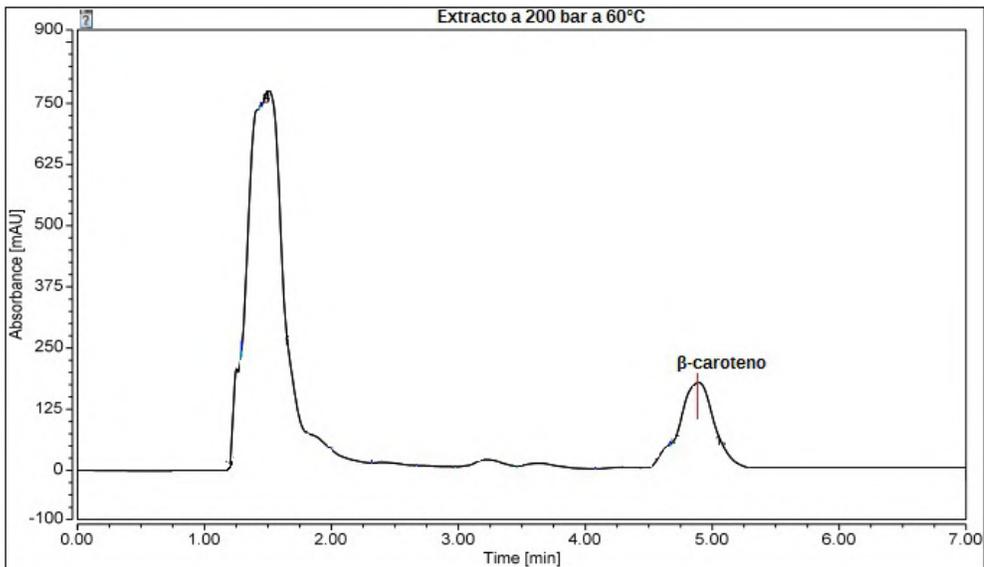


Figura 6: Cromatograma del extracto obtenido a 200 bar y 60 °C.

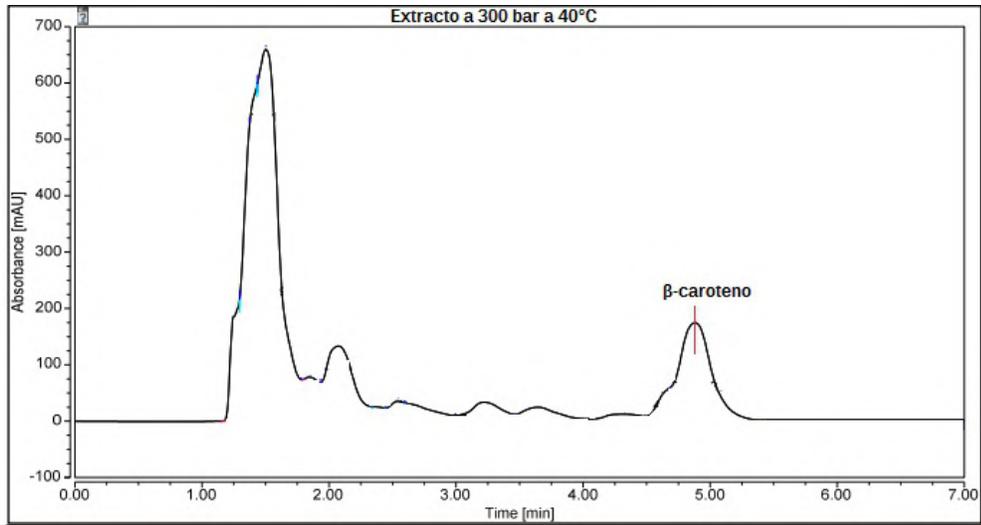


Figura 7: Cromatograma del extracto obtenido a 300 bar y 40 °C.

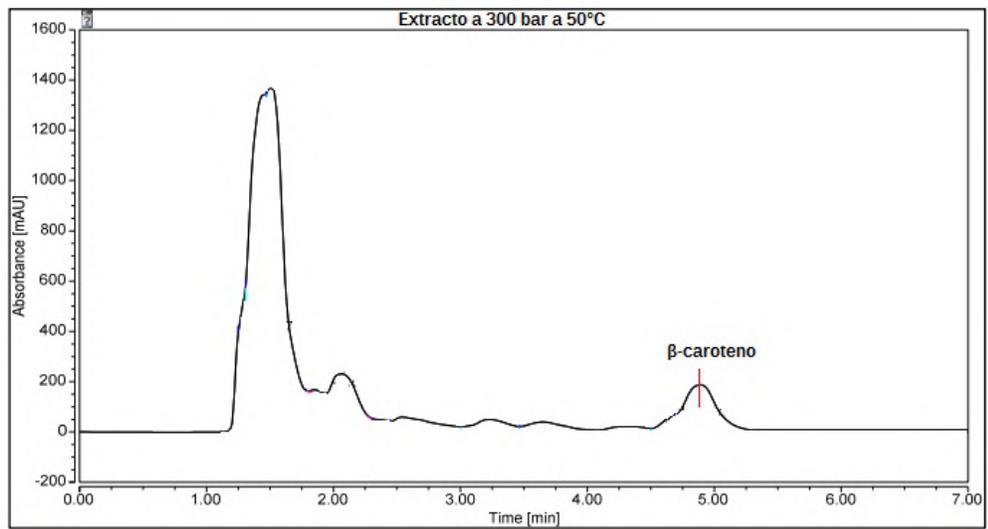


Figura 8: Cromatograma del extracto obtenido a 300 bar y 50 °C.

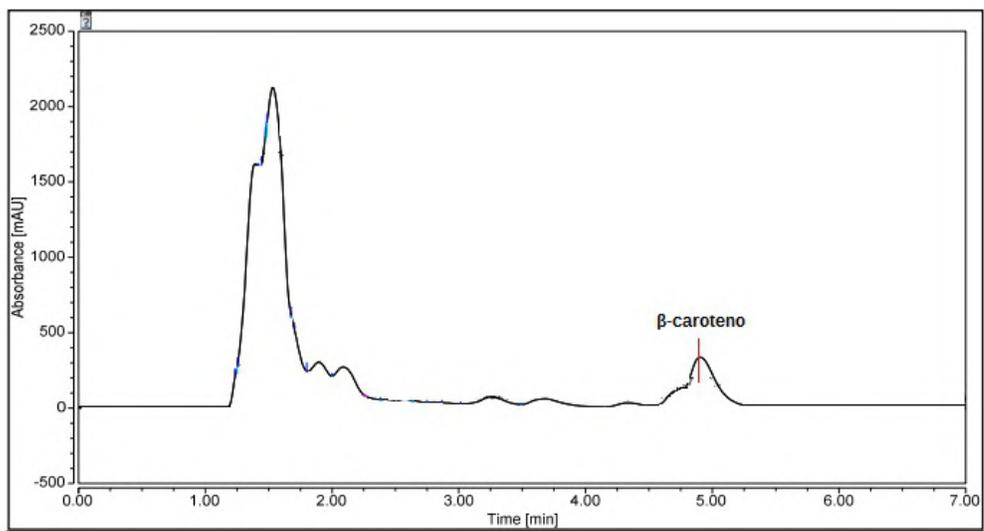


Figura 9: Cromatograma del extracto obtenido a 300 bar y 60 °C.