CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS

AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

"Utilización de un Sistema Secuencial Heterotrófico/Autotrófico para la Producción de *Scenedesmus incrassatulus* con Alto Contenido de Luteína y su Aplicación en la Suplementación de Alimentos Balanceados"

TESIS

Que presenta

M. en C. LILIANA FLÓREZ MIRANDA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la tesis:

Dra. ROSA OLIVIA CAÑIZARES VILLANUEVA

Ciudad de México Mayo, 2018

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado para efectuar mis estudios de Doctorado. Beca CONACyT No. 219268.

Asesores de la Tesis:

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Dr. Fernando José Esparza García

Dr. Felipe Fernando Martínez Jerónimo

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dr. Juan Manuel Cuca García

“Si Jehová no edificare la casa en vano trabajan los que la edifican”

Salmo 127:1

Con profundo amor y admiración a mi amado esposo **Gerardo Reséndiz Cardiel,** por su apoyo e inspiración en esta etapa de mi vida.

A mi precioso hijo **Gerardo Reséndiz Flórez**, por el sacrificio que este proyecto representó para su tiempo y cuidado.

A mi madre **Eumelina Miranda Leal** y a mis hermanos **Edwin** y **Andrea** presentes desde la distancia, por hacer suyos mis sueños y animarme a realizarlos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora **Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva**, por su apoyo y paciencia en la realización de este proyecto. Gracias por ayudarme a crecer como persona y como profesional.

A mi amigo, compañero y maestro **M. en C. Orlando Melchy Antonio**, aunque no pudimos compartir la llegada a la meta, fue un privilegio compartir el camino. Por todos sus consejos y el apoyo en la realización de este trabajo.

A los **miembros de mi comité tutorial** por sus acertadas observaciones y sugerencias para enriquecer este trabajo.

A la **M. en C. Maribel Vásquez Hernández**, por su amistad y su asistencia técnica en la realización de este trabajo.

Al **Dr. Hugo Virgilio Perales Vela**, por su disposición y asesoría incondicional en la realización del análisis de fluorescencia.

Al **Dr. Alfredo Martínez Roldan**, por su amistad y su apoyo en el logro de esta meta.

Al **M. en C. Luis Barbo**, por su asistencia técnica y su apoyo en la realización de determinaciones cromatográficas.

A la **Q.F.B Elvira Ríos Leal** y al **Ing. Gustavo,** por compartir sus conocimientos conmigo y por la disposición en la realización de las determinaciones cromatográficas.

Al **Dr. Jaime Ortega López** y la **M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta**, por su disposición y apoyo en la realización de este proyecto.

Al personal de la **Planta Piloto de Fermentaciones** del Departamento de Biotecnología**,** por su acompañamiento y su disposición para la realización de algunos experimentos de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio **Dulce, Miri, Javi,** por su amistad, sus consejos y su paciencia.

A todos y cada uno de los que colaboraron para que sea posible este peldaño en mi vida, no tengo muchas palabras solo un sincero agradecimiento.

ÍNDICE

RESUMEN 1
ABSTRAC 2
INTRODUCCIÓN 3
CULTIVO DE MICROALGAS 3
Medios de cultivo y heterotrofía 5
Procesos de alta densidad celular 7
Producción de pigmentos en heterotrofía 10
PIGMENTOS CAROTENOIDES: XANTOFILAS Y CAROTENOS 11
Biosíntesis de carotenoides 12
Regulación de la biosíntesis mediada por la luz 14
LUTEÍNA 16
Producción de luteína por microalgas 18
Aplicaciones de la luteína en la alimentación animal 21
ANTECEDENTES DIRECTOS 23
JUSTIFICACIÓN 24
HIPÓTESIS 25
OBJETIVOS 26
GENERAL 26
ESPECÍFICOS 26
MATERIALES Y MÉTODOS 27
CEPA MICROALGAL Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS 27
MEDIO DE CULTIVO Y SELECCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO 27
SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO Y TIPO DE INÓCULO 28
OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLUCOSA Y UREA EN EL MEDIO DE CULTIVO 29
CULTIVO EN BIORREACTOR: OPERACIÓN EN DOS ETAPAS HETEROTROFÍA/AUTOTROFÍA (FOTOINDUCCIÓN) 30
APLICACIÓN DE LA BIOMASA DE *S. incrassatulus* COMO FUENTE DE PIGMENTOS EN DIETAS DE GALLINAS PONEDORAS 31
DETERMINACIONES ANALÍTICAS 32
Análisis de la biomasa 32
Determinación de la concentración de sustratos 34

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 34
MODELO DE CRECIMIENTO 34
RESULTADOS Y DISCUSION 36
DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO DE *Scenedesmus incrassatulus* 36
SELECCIÓN DE LA FUENTE DE N EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO DE *Scenedesmus incrassatulus* 39
ESTABLECIMIENTO DE UN INOCULO HETEROTRÓFICO 46
SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO 46
CULTIVO EN BIORREACTOR DE *Scenedesmus incrassatulus*: HETEROTROFÍA/AUTOTROFÍA 49
Análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila a 54
CULTIVO HETEROTRÓFICO EN LOTE ALIMENTADO 60
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y UREA PARA EL CRECIMIENTO HETEROTROFICO DE *Scenedesmus incrassatulus* 67
LOTE ALIMENTADO CON CONCENTRACIONES INICIALES DE GLUCOSA Y UREA OPTIMIZADAS 80
CULTIVO SECUENCIAL HETEROTROFIA (LOTE ALIMENTADO)/FOTOINDUCCIÓN, TSHP-LOTE ALIMENTADO 83
EVALUACIÓN DE LA BIOMASA DE *S. incrassatulus* COMO FUENTE DE LUTEÍNA PARA LA PIGMENTACIÓN DE LA YEMA DE HUEVO 86
CONCLUSIONES 89
PERSPECTIVAS 90
BIBLIOGRAFÍA 91

RESUMEN

La luteína es un carotenoide utilizado como aditivo alimentario, para la pigmentación de tejidos animales y en la industria farmacéutica. No es sintetizada por el hombre, sin embargo, se encuentra en tejidos como la mácula lútea de la retina y la piel. Actualmente la fuente comercial de luteína es la flor de cempasúchitl o marigold (Tagetes erecta L.), sin embargo, la concentración de luteína en sus pétalos puede ser menor al 0.03% (base seca) y su producción demanda grandes extensiones de terreno. *Scenedesmus incrassatulus*, es una microalga clorofícea de agua dulce que produce luteína como carotenoide mayoritario. En este trabajo, se desarrolló una estrategia de cultivo secuencial heterotrófico/autotrófico para aumentar la producción de biomasa y luteína en *S. incrassatulus*. Como primer paso se diseñó un medio de cultivo mínimo y se determinaron las condiciones para el cultivo heterotrófico. La mejor fuente de nitrógeno fue la urea; la adición de vitaminas (Cianocobalamina, biotina y riboflavina) y una temperatura de cultivo 30°C, favorecieron el crecimiento y la producción de pigmentos en heterotrofía. Se optimizó la concentración inicial de urea y glucosa en el medio y se determinó que la productividad de biomasa en cultivo heterotrófico alcanza valores máximos cuando la concentración inicial de glucosa es de 30 - 50 g L^{-1} y 2.8 - 4 g L^{-1} de urea. Se realizaron cinéticas en lote y lote alimentado y se obtuvieron cultivos con alta densidad celular de *S. incrassatulus* (>30 g L^{-1}). La fase de fotoinducción autotrófica permitió aumentar el contenido de luteína en la biomasa 8 veces con respecto del final del cultivo heterotrófico, alcanzando una productividad de 3.074 ± 0.434 mg L^{-1} d^{-1}. Se demostró la utilidad de la biomasa de *S. incrassatulus* como fuente de xantofilas, principalmente luteína, para la pigmentación de la yema de huevo, registrando un contenido de luteína en la yema de 0.382 ± 0.021 mg, un 20% más que con el pigmento comercial.

ABSTRAC

Lutein is a carotenoid used as food additive, for the pigmentation of animal tissues, drugs and cosmetics. It is not synthesized by the humans but, is present in tissues as macula of the retina and skin. Marigol (Tagetes erecta) or Cempasuchitl has been commercialized as source of lutein, however, the lutein content in marigold petals can be as low as 0.03% and its production is a land-demanding process. *Scenedemus incrassatulus*, is a chloroficea microalgae of fresh wather and lutein is the major carotenoid accumulated for it. In this study, a biomass production process including two stages, heterotrophy/photoinduction (TSHP), was developed to improve biomass and lutein production by *S incrassatulus*. A minimal culture medium was designed and conditions for heterotrophic culture were determined. The highest biomass productivity and specific pigment concentrations were reached using urea + vitamins (Cianocobalamina, biotina y riboflavina) at 30 °C. The initial concentration of urea and glucose was optimized and the highest biomass productivity was achieved at 30-50 g L^{-1} glucose and 2.8-4 g L^{-1} urea. Batch and fed batch cultures using a fermentor were done and high cell density cultures of *S incrassatulus* were obtained (>30 g L^{-1} biomass). After of autotrophic photoinduction, lutein content in *S. incrassatulus* biomass was 8 times higher than that obtained at the end of heterotrophic cultivation, and the lutein productivity reached 3.074 ± 0.434 mg L^{-1} d^{-1}. The potential of the biomass of *S. incrassatulus* as a source of xanthophylls, mainly lutein, at pigmentation of the egg yolk was demonstrated, achieving a lutein content in the yolk of 0.382 ± 0.021 mg, 20% more than the pigment commercial.

INTRODUCCIÓN

CULTIVO DE MICROALGAS

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos que poseen clorofila a y otros pigmentos y agrupan miembros procariotas y eucariotas, pueden ser unicelulares o pluricelulares, no poseen órganos diferenciados y son microscópicas. Se les considera como los organismos autotróficos de mayor velocidad de crecimiento sobre la tierra, usualmente requieren para su crecimiento sales minerales, CO_2, agua y luz solar (Blanco et al., 2007). Durante décadas las microalgas han sido estudiadas con el objetivo de evaluar su capacidad práctica y potencial en la producción de diversos productos metabólicos, como suplementos alimenticios, lípidos, enzimas, biomasa, polímeros, toxinas y pigmentos, así mismo, para el tratamiento de aguas residuales y en la producción de biocombustibles (Perez-Garcia et al., 2011).

Las microalgas generalmente se cultivan autotróficamente, aprovechando su capacidad fotosintética, de esta forma obtienen su energía de la luz y utilizan el CO_2 como fuente de carbono. Los sistemas de cultivo convencionales simulan lagunas agitadas e iluminadas de manera natural, el más utilizado es del tipo "raceway", que es un estanque de forma ovalada, poco profundo (15-20cm de nivel de agua) que opera como un circuito de carrusel, donde el líquido es impulsado por paletas rotatorias. Este sistema generalmente ocupa extensas áreas de terreno (500- 5000m^3) y tienen como ventaja sus bajos costos de construcción y operación. No obstante presentan ciertos inconvenientes que dificultan el desarrollo de la producción microalgal, a) la difusión de la luz disminuye con la profundidad, lo cual se agrava en cultivos intensivos donde el aumento de la densidad celular produce autosombreado, con la consecuente limitación del crecimiento; b) el mantenimiento de cultivos axénicos es prácticamente imposible dado que son sistemas abiertos, expuestos a la contaminación constante; c) en muchos casos la producción está sujeta a los cambios climáticos, por lo que no se puede llevar a cabo de forma permanente; d) la recuperación de la biomasa es muy laboriosa y está limitada por las bajas densidades celulares; e) este tipo de sistemas está restringido a especies que presenten alguna ventaja competitiva frente a otros organismos, ya sea una mayor velocidad de crecimiento o la

capacidad de crecer en condiciones adversas de pH, temperatura o radiación. Estos aspectos han llevado al desarrollo de sistemas cerrados, llamados fotobiorreactores (Contreras-Flores et al., 2003).

El diseño de fotobiorreactores ha contribuido a mejorar la productividad de los cultivos de microalgas con más independencia de las condiciones ambientales, el mantenimiento de los cultivos sin contaminación y un mayor control del pH, de la temperatura y de la difusión de los gases; lo que ha hecho posible la producción de metabolitos con aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Perez-Garcia et al., 2011); sin embargo en estos sistemas al igual que en los sistemas abiertos, la penetración de la luz es un factor limitante en el proceso y ha sido objeto de numerosos estudios enfocados al desarrollo de configuraciones que permitan alcanzar altas productividades con una baja inversión en infraestructura y mantenimiento.

Aunque la mayoría de las especies de microalgas son fotoautótrofas, algunas de ellas son heterótrofas obligadas y otras pueden tener un metabolismo heterotrófico y fotoautotrófico secuencial o simultáneamente (Bumbak et al., 2011). La heterotrofía es una alternativa para el cultivo de microalgas con la cual se supera la limitación por luz de los sistemas fototróficos. Bajo un régimen heterotrófico, las microalgas obtienen la energía y el carbono necesarios para su metabolismo a partir de compuestos orgánicos; en estos términos un proceso microalgal operado en heterotrofía, no es muy diferente a los bioprocesos establecidos para bacterias o levaduras, lo que permite el uso de fermentadores para el cultivo de microalgas, como los empleados para la producción industrial de medicamentos, cerveza, aditivos alimentarios, etc. El principal atractivo de los procesos heterotróficos es la simplicidad de operación y la facilidad de mantenimiento, que se traducen en una disminución de costos (Perez-Garcia et al., 2011).

En la actualidad, pocas especies microalgales se han cultivado heterotróficamente a escala industrial, los procesos más sobresalientes han estado enfocados a la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés). La empresa Market Biosciences, Co. ha establecido un protocolo para la obtención de DHA a partir de *Crypthecodinium cohnii*, empleando un fermentador convencional de 150 000 L de capacidad, operado heterotróficamente en un sistema por lote (Chen, 1996). Se han desarrollado numerosos estudios

a escala de laboratorio que demuestran el potencial de diversas especies para producir metabolitos de interés como pigmentos (Ogbonna et al., 1997; Shi et al., 1999; Wei et al., 2008), ácidos orgánicos (Chen and Johns, 1995) y biocombustibles (Perez-Garcia et al., 2011) bajo estas condiciones. En la tabla 1 se resumen las características de crecimiento de diferentes microalgas, obtenidas a partir de cultivos heterotróficos operados en lote. Se pueden observar microalgas con velocidades de crecimiento relativamente altas (> 0,09 h^{-1}) como *Chlorella* spp, *Nitzschia* spp y *Prototheca* spp, así como especies con tolerancias elevadas a sustratos orgánicos como es el caso de *Galdieria sulphuraria* y *Schizochitrium* sp.

Algunas de las características que deben presentar las microalgas para poderse cultivar heterotróficamente son: a) facultad para dividirse y mantener activo su metabolismo en ausencia de la luz; b) habilidad para crecer en medios de cultivo con sustratos orgánicos fácilmente esterilizables, donde la energía requerida para el crecimiento pueda suplirse por la oxidación parcial de dicho sustrato; c) habilidad para adaptarse a cambios ambientales repentinos y d) la capacidad para resistir el estrés hidromecánico generado en los fermentadores (Perez-Garcia et al., 2011). Un requisito importante para el establecimiento de un cultivo heterotrófico de microalgas, es contar con un inóculo monoalgal, libre de contaminación bacteriana y mantener condiciones axénicas durante la operación del biorreactor, debido a que la velocidad de crecimiento de las bacterias es mayor que la de las microalgas, aún una contaminación mínima puede estropear el cultivo (Bumbak et al., 2011).

Medios de cultivo y heterotrofía

De manera general, para el crecimiento heterotrófico se emplean los mismos medios utilizados en el cultivo autotrófico, con la diferencia de que se adiciona un sustrato de carbono orgánico. Muchos de los medios de cultivo han sido desarrollados en base a la composición estequiométrica de la biomasa microalgal, crecida en condiciones de cultivo regulares (pH, temperatura e iluminación, consideradas adecuadas para el crecimiento); existe poca información acerca de la composición de la biomasa en relación con un producto particular. Para el cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* se ha empleado una estequiometría molar de $C_{3.96}H_{7.9}O_{1.875}N_{0.685}P_{0.0539}K_{0.036}Mg_{0.012}$, en el desarrollo y optimización de medios de cultivo

para procesos de alta densidad celular (Bumbak et al., 2011). En los medios diseñados para soportar un crecimiento óptimo en heterotrofía, todos los elementos se adicionan en exceso con base en su requerimiento estequiométrico, excepto el C, que es considerado el nutriente limitante, ya que todas las biomoléculas lo contienen como principal constituyente.

Tabla1. Características de crecimiento de diferentes microalgas en cultivos heterotróficos en lote. Los datos fueron tomados de diferentes autores y compilados por Bumbak et al. (2011).

Especie	μ max (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($g\ g^{-1}$)	T (°C)	pH	$S_{inhibitoria}$ ($g\ L^{-1}$)
Chlamydomonas reinhardtii	0.035	0.52	35	6.9	>0.4
Chlorella protothecoides	0.09	0.47	28	6.6	>24
Chlorella pyrenoidosa	0.201	0.5	35	6.9	>10
Chlorella regularis	0.240	0.6	36	6.5	>10
Chlorella vulgaris	0.180	0.55-0.69	36	6.0-7.5	----
Chlorella zofingiensis	0.031	0.44	30	5.5	>20
Galdieria sulphuraria	0.045-0.048	0.48-0.5	42	2	>200
Nitzschia alba	0.106	-----	30	----	----
Prototheca zopfii	0.330	0.81	21	7.2	----
Scenedesmus acutus	0.040	----	30	6	>1
***Schizochytrium* sp**	0.071	0.42	27	7	>200

Aunque las microalgas pueden utilizar diferentes compuestos carbonados para crecer, la glucosa es la fuente de carbono más utilizada, por su fácil asimilación, manipulación, accesibilidad y seguridad. El ácido acético y el etanol son fuentes alternativas de carbono, pero debido a su naturaleza corrosiva e inflamable, se prefiere su uso sólo cuando hay un aumento excepcional en la productividad celular o de un metabolito específico (De Swaaf et al., 2003; Ogbonna and Tanaka, 1998; Perez-Garcia et al., 2011).

El nitrato y la urea son las fuentes de nitrógeno más empleadas para el cultivo heterotrófico de microalgas en biorreactores; el extracto de levadura se ha utilizado no sólo por su aporte de

nitrógeno sino por su contenido de aminoácidos, vitaminas y microelementos, sin embargo, debido a que es un sustrato complejo con alto contenido de carbono y de composición muy variable, es muy complicado tener un control estequiométrico del medio de cultivo cunado se utiliza extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Es necesario tener en cuenta que una gran variedad de especies microalgales en cultivo puro, requieren de vitaminas, especialmente cobalamina y/o tiamina, las cuales deben ser suplidas en el medio de cultivo para su crecimiento óptimo (Bumbak et al., 2011) (Carvalho et al., 2006).

Procesos de alta densidad celular

Una de las limitantes para el aprovechamiento industrial de las microalgas es la baja densidad celular de los cultivos, debido a la limitación por luz; se estima que en un cultivo con 30 g L^{-1} de biomasa, la penetración de la luz es de tan sólo 2 mm (Chen and Johns, 1995), lo que hace muy complicada la obtención de altas densidades celulares (>10g L^{-1}) en sistemas iluminados. La densidad celular es un factor muy importante en los cultivos de microalgas, ya que influye mucho en los costos de recuperación de la biomasa. Para cultivos heterotróficos se han reportado entre 50 y 100 g L^{-1} de biomasa seca para microalgas como *Nitzschia alba, Chlorella vulgaris* y *Crypthecodinium cohnii*, empleando técnicas de cultivo que promueven la obtención de altas densidades celulares, como el cultivo en lote alimentado y el cultivo de perfusión (De Swaaf et al., 2003) (Gladue and Maxey, 1994) (Doucha and Lívanský, 2012), sin embargo; esto depende de las características de cada especie y de las condiciones de cultivo.

El término “cultivo de alta densidad celular” no está bien definido para cultivos microalgales y generalmente se aplica a aquellos valores de biomasa que caen en el intervalo de los mayores valores publicados para condiciones de autotrofía y heterotrofía. En los sistemas fototróficos la mayor concentración de biomasa, reportada por (Doucha and Lívanský, 2012) fue de 40 g L^{-1} de peso seco, empleando un fermentador tipo “thin-layer”. Por otro lado, en cultivos heterotróficos en sistemas por lote alimentado, las concentraciones obtenidas de biomasa han superado los 100 g L^{-1} para especies como *Chlorella vulgaris* y *Crypthecodinium cohnii*, adicionalmente es necesario tener en cuenta que muchas especies incrementan el peso de su biomasa considerablemente durante la fase de crecimiento estacionario, donde se acumulan

lípidos y otros productos de reserva, sin que esto implique un aumento en el número de células (Bumbak et al., 2011; De Swaaf et al., 2003; Doucha and Lívanský, 2012).

El principal objetivo de los cultivos de alta densidad celular es obtener la mayor concentración de producto de alta calidad en el menor tiempo posible, esto no siempre coincide con los mayores valores de producción de biomasa (para procesos en los que se busca obtener un metabolito específico), de acuerdo a los modelos cinéticos de crecimiento, la velocidad máxima de crecimiento (μmax, h^{-1}), no está directamente relacionada con la máxima tasa de formación de un producto y en algunos casos la formación de un producto puede tener una correlación negativa con el crecimiento (Bumbak et al., 2011). Así mismo, existen diferencias entre la respuesta a un sustrato para el crecimiento y aquella para la formación de un metabolito, por ejemplo *C. cohnii* cultivado con acetato como fuente de carbono produjo 77 g L^{-1} de biomasa y 9.5 g L^{-1} de DHA, a las 210 h de cultivo; mientras que al emplear etanol como sustrato, la concentración de biomasa disminuyó un 23.3 %, pero la producción de DHA aumentó 9.5%, en 200 h de cultivo (De Swaaf et al., 2003). En la tabla 2 se presentan algunos datos obtenidos en cultivos heterotróficos en lote alimentado.

Se ha demostrado que el empleo de sistemas de cultivo en lote alimentado resulta de gran utilidad para obtener altas densidades celulares, ya que este tipo de operación evita la inhibición causada por substrato, lo cual resulta muy atractivo en el caso de las microalgas, porque la mayoría de las especies son más sensibles a los substratos orgánicos que las bacterias o las levaduras (Bumbak et al., 2011; Chen and Johns, 1995). El término “cultivo en lote-alimentado o lote-semicontinuo”, fue introducido por Yoshida et al. (1973) para referirse a un cultivo en lote al cual se adiciona continua o intermitentemente una solución nutritiva concentrada hasta alcanzar un volumen determinado; la simplicidad de su operación ha hecho que esta técnica se haya difundido ampliamente en la industria biotecnológica, al compararse con otras técnicas para obtener alta densidad celular, como son el cultivo continuo y el empleo de reactores de membrana o cultivo de perfusión (Chen, 1996).

Tabla 2. Características y estrategias para alta densidad celular en cultivo heterotrófico de microalgas empleando lote alimentado Modificado de Bumbak et al. (2011).

Especie	$X\ f_{in}$ ($g\ L^{-1}$)	Producto	C_p ($g\ L^{-1}$)	Sustrato	$S_{o,lote}$ ($g\ L^{-1}$)	S_{ali} ($g\ L^{-1}$)	V_0 (L)	t (h)	Estrategia de control
Chlorella protothecoides	51.2	Lípidos	25.8	Glucosa	19.5	100	5	167	Pulsos
Chlorella protothecoides	48.0	Lípidos	0.22	Glucosa	40	240	2.5	240	Pulsos
Chlorella pyrenoidosa	116.2	Biomasa	----	Glucosa	10	499	10	118.5	Escalonado
Chlorella vulgaris	117.2	Biomasa	----	Glucosa	65	500	35	32	Pulsos
Chlorella zofingiensis	51.8	Astaxantina	0.03	Glucosa	20	----	2	360	Pulsos
Cryptecodinium cohnii	109.0	DHA	19.0	Acetato	5.75	1049	1	400	pH
Euglena gracilis	48.0	α-tocoferol	0.01	Glucosa	15	696	2.5	182	Pulsos
Galdieria sulphuraria	109.0	Ficocianina	2.9	Glucosa	50	500	1.2	336	Escalonado
Nitzschia laevis	40.0	EPA	1.1	Glucosa	20	50	2.2	336	Escalonado

X_{fin}, concentración de biomasa en peso seco al final del proceso; C_p, concentración del producto al final del proceso; $S_{0,lote}$, concentración del sustrato al inicio de la fase lote; S_{ali}, concentración del sustrato en la solución de alimentación; V_0, volumen inicial del cultivo; t, tiempo de cultivo; DHA, ácido docosahexaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico.

Producción de pigmentos en heterotrofía

Una de las limitantes del cultivo heterotrófico de microalgas es la producción de metabolitos inducidos por la luz, este es el caso de los pigmentos, los cuales se encuentran asociados a las clorofilas y tienen una función protectora ante el daño producido por la radiación solar, sin embargo se ha encontrado que diferentes especies clorofíceas pueden producir carotenoides en heterotrofía, bajo condiciones específicas de crecimiento (Doucha and Lívanský, 2012; Perez-Garcia et al., 2011; Shi et al., 1999). Una de las alternativas a esta limitante es el cultivo mixotrófico, donde se proporcionan al reactor tanto el carbono orgánico como la luz, sin embargo en condiciones mixotróficas las concentraciones celulares de los productos fotosintéticos dependen de la relación entre la tasa de crecimiento fotosintética y la tasa de crecimiento heterotrófica, adicionalmente la producción fotosintética está limitada por la luz, y la concentración de los metabolitos fotosintéticos, así como el contenido de proteína son menores que los obtenidos en autotrofía (Ogbonna et al., 1997). En estudios de Ogawa and Aiba (1981) empleando *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* cultivados en mixotrofía, el contenido de clorofila total fue 61.4% y 45.5% del respectivo valor en autotrofía, pese a que su velocidad de crecimiento fue aproximadamente el equivalente a la suma de la velocidad de crecimiento en autotrofía y heterotrofía (0.19 h^{-1} y 0.05 h^{-1} respectivamente).

De acuerdo con los estudios realizados por Ogbonna et al. (1997) es posible integrar el cultivo heterotrófico y el cultivo fotoautotrófico en un sistema secuencial, para producir de manera eficiente biomasa y metabolitos inducidos por la luz. Dichos autores lograron incrementar cerca de cuatro veces la producción de biomasa de *Chlorella pyrenoidosa* utilizando un tanque agitado, en cultivo por lote bajo condiciones heterotróficas. Cuando la concentración de glucosa fue reducida a 0 g L^{-1}, el cultivo con una concentración de 14 g L^{-1}, fue transferido a un fotobiorreactor y se adicionó un flujo constante de aire (3 vvm) enriquecido con 5% de CO_2 para favorecer la autotrofía; el contenido de clorofila aumentó rápidamente durante las primeras 24 horas de la fase autotrófica, alcanzando una concentración muy cercana a la reportada para cultivos netamente autotróficos (3.6%).

PIGMENTOS CAROTENOIDES: XANTOFILAS Y CAROTENOS

Los pigmentos naturales son sustancias presentes en las células de diferentes organismos, capaces de absorber y reflejar la luz en diferentes longitudes de onda, otorgando de esta manera, color a los tejidos donde se encuentran. Los carotenoides son un grupo extenso de pigmentos insolubles en agua, con un esqueleto de 40 átomos de carbono formado a partir de unidades de isopreno, el cual presenta numerosos dobles enlaces conjugados (Breithaupt, 2007). Los carotenoides poseen una importancia particular por su papel en la fotosíntesis y en la fotoprotección, ya que forman parte de los complejos cosechadores de luz, se desempeñan como antioxidantes en tejidos humanos, así como filtros para la luz azul, protegiendo la piel y los ojos de la radiación. Adicionalmente por su aplicación como colorantes alimentarios han ganado un mayor interés en el campo industrial (Fernandez-Sevilla et al., 2010).

Los carotenoides son sintetizados principalmente por organismos fotosintéticos, como las plantas y las microalgas, sin embargo también pueden ser producidos por algunas bacterias y hongos (Jin et al., 2003) los animales no pueden llevar a cabo la síntesis de carotenoides *de novo,* por lo que su presencia y concentración en la sangre o en diversos tejidos tiene su origen en la dieta, una vez consumidos pueden ser acumulados o transformados, originando metabolitos con una gran variedad de estructuras.

Los carotenoides se dividen en dos familias de acuerdo con la presencia o ausencia de oxígeno en su estructura, los derivados oxigenados se denominan xantofilas, mientras que aquellos que carecen de oxígeno en su molécula se conocen como carotenos. En la figura 1, se aprecian las estructuras de algunas xantofilas y carotenos. La presencia de grupos hidroxilo y carbonilo en su estructura, aumenta la solubilidad de las xantofilas y por ende su distribución en los tejidos animales; se pueden encontrar principalmente en la carne, los huevos y la piel de los peces; en el caparazón de los crustáceos y en el caso de las aves, en la grasa subcutánea, la piel, la yema de huevo, el hígado, los tegumentos y las plumas (Breithaupt, 2007).

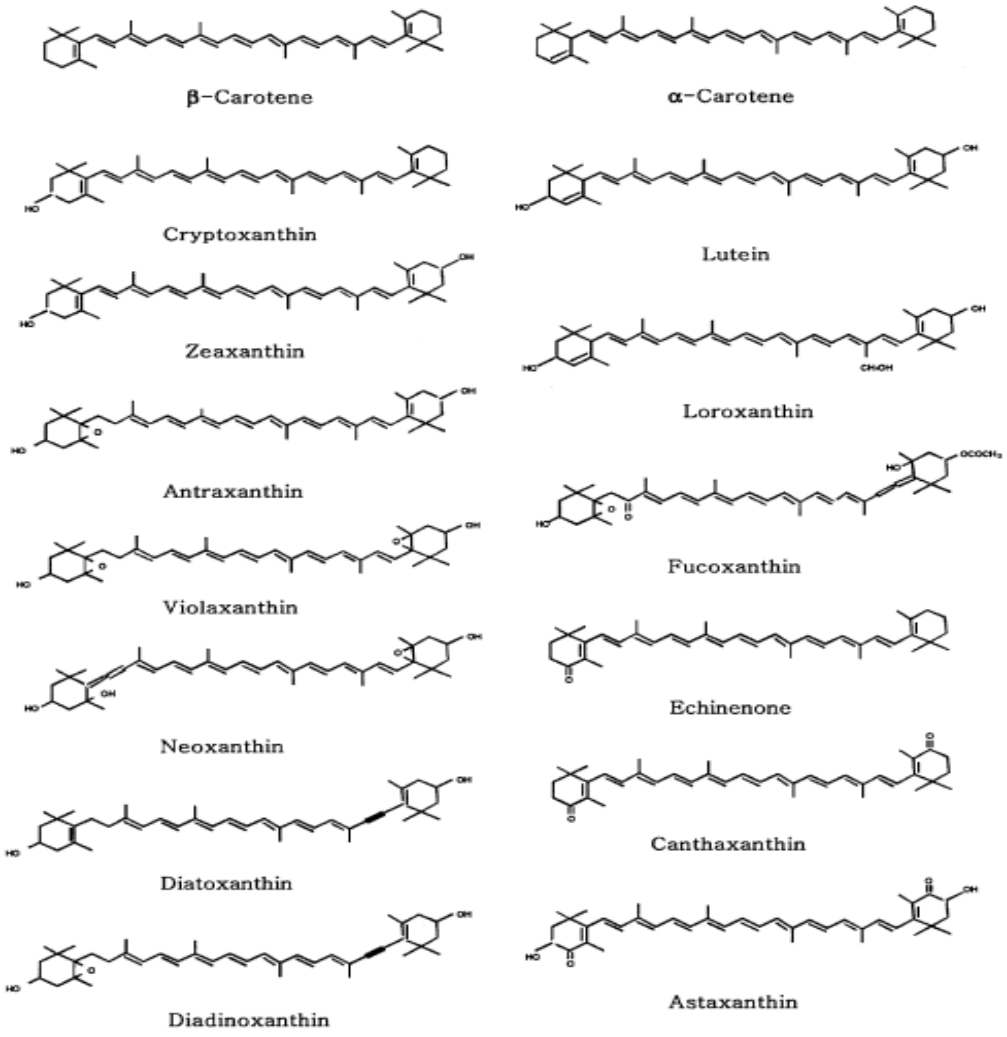


Figura 1. Estructura química de diferentes carotenoides, se incluyen tanto las xantofilas presentes en las plantas (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina y luteína), como algunas propias de diversos géneros microalgales tales como, loroxantina, astaxantina, cantaxantina, producidas por clorofíceas y diatoxantina, diadinoxantina y fucoxantina, de algas pardas y diatomeas (Jin et al., 2003).

Biosíntesis de carotenoides

La ruta biosintética de carotenoides es un sistema secundario complejo, altamente conservado en los organismos carotenogénicos (Li et al., 2007), en la figura 2, se esquematiza la ruta biosintética de diversos carotenoides, la cual se inicia con la condensación de dos

moléculas de geranilgeranil difosfato (GGPP), por la fitoeno sintasa (PSY), para formar una molécula de fitoeno; mediante dos pasos de desaturación la fitoeno desaturasa (PDS), transforma el fitoeno en ζ-caroteno, el primer compuesto colorido de la ruta y que sirve como sustrato para la ζ-caroteno desaturasa (z-CDS), produciendo el pro-licopeno que es transformado por la caroteno isomerasa (CRTISO) en licopeno. Posteriormente el licopeno es convertido en diferentes moléculas bicíclicas. La β-ciclasa (LCYB) introduce secuencialmente dos anillos en los extremos de la molécula de licopeno, generando γ-caroteno y finalmente β-caroteno. Por otra parte, una ε-ciclasa (LCYE) puede formar el primer anillo en la molécula de licopeno con la posterior intervención de la β-ciclasa, dando como resultado α-caroteno. La hidroxilación del β-caroteno por la β-caroteno hidroxilasa (CβHx) conduce a la formación de zeaxantina, mientras que la acción de la ε-caroteno hidroxilasa (CeHx) y la CβHx sobre el α-caroteno produce luteína (Pizarro Arcos and Stange, 2009).

Los carotenoides producidos por microalgas pueden clasificarse en primarios o secundarios, de esta manera, las xantofilas primarias son aquellas que forman parte del sistema fotosintético por lo que cumplen con una función estructural y funcional que las hace indispensables para la supervivencia celular; las xantofilas secundarias, son por lo general producidas en grandes cantidades después de un estímulo externo que induce la carotenogénesis. Esta condición presenta una ventaja para la producción industrial de pigmentos, un ejemplo claro de esto es la astaxantina, que es acumulada en grandes cantidades por *Haematococcus pluvialis* y actualmente es producida a gran escala (Margalith, 1999).

En la mayoría de las microalgas los carotenoides se sintetizan en los plastidios donde se acumulan, asociados a las membranas o a proteínas, a través de enlaces no covalentes. Las xantofilas primarias, se encuentran en las membranas tilacoides, mientras que las xantofilas secundarias se acumulan en vesículas lipídicas, ya sea en el estroma o en el citosol (Jin et al., 2003).

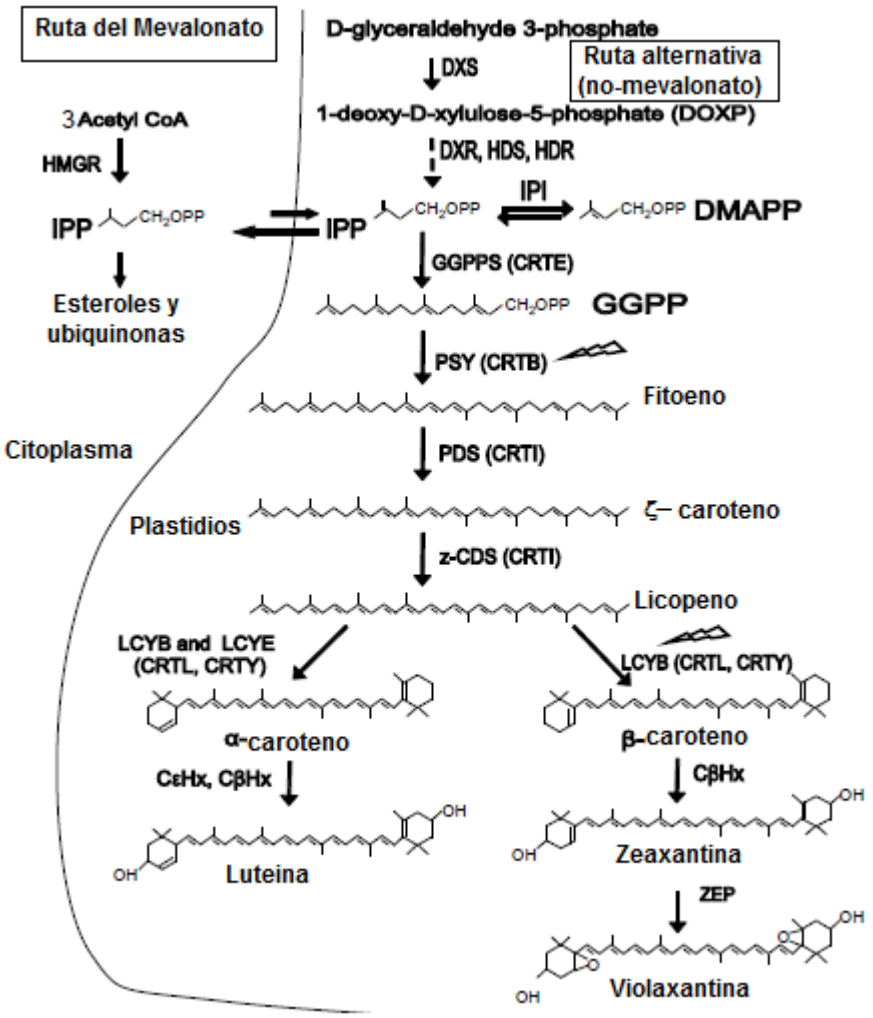


Figura 2. Esquema de las rutas de biosíntesis de diferentes carotenoides. Incluye la biosíntesis de la luteína y la zeaxantina en plantas y microalgas. Indica reacciones reguladas por la luz.

Regulación de la biosíntesis mediada por la luz

La luz juega un papel importante en la inducción de genes carotenogénicos en plantas, estudios realizados en órganos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas revelan que la regulación se lleva a cabo a nivel transcripcional e involucra diferentes fotorreceptores, entre los que se encuentran los fitocromos (PHY), los criptocromos (CRY) y las fototropinas, los

cuales se han encontrado también en microalgas (Chisti, 2007) los más estudiados y caracterizados son los fitocromos los cuales absorben luz roja e infrarroja, mediante una interconversión entre dos isoformas Pr y Pfr. La forma Pr absorbe luz a 660 nm (roja) con lo cual se activa y se transforma en Pfr, esta isoforma activada es translocada al núcleo donde puede intervenir directamente activando factores de transcripción (TF) o bien actuando en conjunto con fotorreceptores de la familia de los CRY, los cuales son activados por fosforilación. Pfr y CRY promueven la liberación de factores de transcripción del signalosoma, un complejo proteico asociado al proteosoma, encargado de la degradación de factores de transcripción regulados por la luz, durante periodos de oscuridad. Posteriormente los TF se unirán a secuencias denominadas elementos de respuesta a la luz (LREs), situados en el promotor de los genes comúnmente regulados por la luz. Los LREs más comunes son del tipo ATCTA y los sitios G1 (CACGAG) y G2 (CTCGAG), así como la caja-Z (ATCTATTCGTATACGTGTCAC). En la figura 3, se esquematiza el modelo de regulación de la carotenogénesis mediada por la luz, que se ha propuesto en plantas (Pizarro Arcos and Stange, 2009).

Se ha propuesto otra vía de regulación de la carotenogénesis que involucra el potencial redox generado durante la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis, en ésta la plastoquinona actúa como inductor de los genes carotenogénicos. Un ejemplo de lo anterior es lo que ocurre cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas durante la exposición a intensidades elevadas de luz, estimulan la acumulación de astaxantina en *Haematococus pluvialis* o la producción de β-caroteno en *Dunaliella salina* (Pizarro Arcos and Stange, 2009), sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos de inducción.

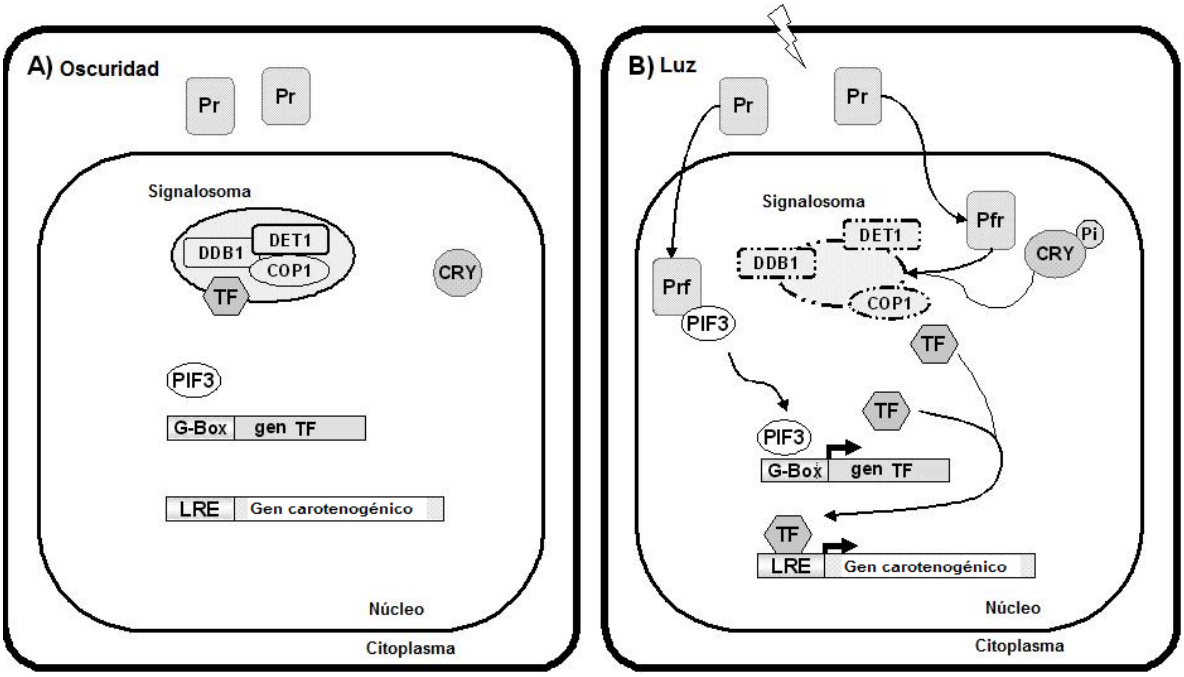


Figura 3. Modelo de regulación de la transcripción de genes involucrados en la carotenogénesis de plantas, mediada por la luz. En A, se esquematiza el estado de la maquinaria transcripcional en ausencia de luz y B muestra los cambios ocurridos una vez que se da la activación por la luz.

LUTEÍNA

Pese a la gran variedad de xantofilas presentes en la naturaleza, solo unas cuantas como la astaxantina, la cantaxantina y la luteína, poseen importancia a nivel comercial. La luteína ((3R,3´R,6´R)-β,ε-caroteno-3,3´-diol), junto con la zeaxantina son xantofilas presentes en la mácula lútea y evitan el daño fotooxidativo de la retina (Cardozo et al., 2007). Diferentes estudios han demostrado la correlación entre el consumo de luteína/zeaxantina y la disminución o prevención de la degeneración macular relacionada con la edad (DME), se estima que tan solo en el mundo occidental cerca de 100 millones de personas están en riesgo de padecer DME, y se recomienda una dosis de 5 mg de luteína diarios (Fernandez-Sevilla et al., 2010). Además de su papel en la prevención de la DME, recientemente se ha demostrado que tiene un efecto inmunoestimulante, anticancerígeno e incrementa la

proliferación de linfocitos en procesos infecciosos (Wang et al., 2006). Algunas evidencias soportan un papel protector de la luteína en contra del desarrollo de enfermedades crónicas y de padecimientos vinculados con la vejez, así como de arteriosclerosis temprana (Blanco et al., 2007).

La luteína ha sido ampliamente utilizada para la pigmentación de tejidos animales, en la coloración de alimentos, medicamentos, cosméticos y como aditivo funcional en alimentos infantiles (Wei et al., 2008). Esta xantofila es uno de los diez fitoquímicos recomendados por la FDA como suplemento nutricional GRAS (siglas en inglés de Generally Recognized As Safe) (Wang et al., 2006) y debido al creciente interés de la luteína en la salud humana, se ha desarrollado una gran variedad de alimentos funcionales, con la intención de satisfacer las necesidades nutricionales de la población. Pese a que la luteína no posee una función de provitamina-A como el β-caroteno (Wang et al., 2006), su reconocimiento como vitamina está en discusión, con base en tres requisitos que deben cumplir los nutrientes esenciales: a) no debe ser sintetizado por el metabolismo humano y debe ser ingerido; b) el consumo de dietas carentes de luteína causa ceguera en primates y c) esta disfunción puede ser revertida si se suministra luteína en la dieta o bien como suplemento, siempre y cuando la condición no sea irreversible (Fernandez-Sevilla et al., 2010).

En el año 2010 el mercado mundial para la luteína fue estimado en $ 233 millones de dólares y se espera que en 2018 sea de $308 millones de dólares, con una tasa de crecimiento anual de 3.6% (Lin et al., 2015). En Estados Unidos su principal aplicación fue como pigmento en la alimentación animal (Yen et al., 2011).

Actualmente la fuente comercial de luteína es la flor de *cempasúchitl* o *marigold* (*Tagetes erecta L.*), de donde, mediante la extracción con solventes orgánicos se obtienen las oleorresinas de los pétalos con una concentración de luteína que varía entre 5% y 50%, principalmente en forma de diéster; este producto es emplea generalmente para la formulación de suplementos alimenticios; posteriormente, la luteína se purifica por un proceso que involucra la saponificación, concentración y cristalización, sin embargo los cristales de luteína son muy difíciles de manipular, por lo que generalmente se comercializa

en suspensión en aceites de girasol o maíz. El principal inconveniente de usar *marigold* como fuente de luteína es que su concentración en los pétalos es muy variable y puede llegar a ser menor al 0.03 %, por lo que este proceso de producción resulta económicamente desfavorable, además de que demanda grandes extensiones de terreno (Fernandez-Sevilla et al., 2010; Lin et al., 2015). Por otra parte, la síntesis química de luteína es un proceso muy tardado (Breithaupt, 2007) y su costo no compite con el proceso a base de *marigold* (Fernandez-Sevilla et al., 2010).

Diferentes especies de microalgas han demostrado la capacidad para producir luteína alcanzando un contenido mayor que los pétalos de *marigold.* Entre los factores que soportan el uso de microalgas como fuente alternativa de luteína, frente al *marigold*, se consideran: a) su alto contenido de luteína (0.32-1.2% del peso seco); b) la posibilidad de procesar toda la biomasa; c) se puede obtener una biomasa homogénea, con una tasa de producción constante que permita un proceso de extracción más preciso y d) es posible obtener subproductos, como proteína unicelular, otros pigmentos y lípidos, dependiendo de la cepa de interés. Aunque las microalgas ofrecen algunas ventajas con respecto a la flor de *cempasúchitl* como fuente de luteína, los costos de producción aún son un factor limitante en el establecimiento del bioproceso, ya que la producción de microalgas demanda una mayor inversión tecnológica que el cultivo de *marigold* (Fernandez-Sevilla et al., 2010; Lin et al., 2015). Debido a esto, todos los estudios enfocados al desarrollo de la producción de luteína por microalgas deben enmarcarse en una estrategia de aprovechamiento integral de diferentes subproductos que hagan más rentable el proceso.

Producción de luteína por microalgas

Las microalgas pueden sintetizar todas las xantofilas presentes en plantas superiores, incluyendo la luteína, por lo que diferentes especies de microalgas se han evaluado como fuente de luteína, entre ellas se encuentran *Muriellopsis* sp. (Blanco et al., 2007), *Chlorella zofingensis* (Del Campo et al., 2004), *Chlorella protothecoides* (Shi et al., 1999) y *Scenedesmus almeriensis* (Sánchez et al., 2008a; Sánchez et al., 2008b). Cada una de estas cepas presenta características interesantes para el desarrollo de un bioproceso a escala

industrial. De manera general, el éxito de las microalgas para la producción de luteína u otro metabolito de interés comercial depende de dos factores; el contenido del bioproducto en la célula y la productividad de biomasa. Cuando el objetivo es mejorar la producción, se pueden dirigir esfuerzos en cualquiera de las dos direcciones.

En la tabla 3, se presenta un resumen de los diferentes estudios realizados sobre la producción de luteína con microalgas. Los resultados muestran contenidos de luteína entre 0.4 y 0.8 % en base al peso seco, valores que superan el contenido reportado para los pétalos de *marigold*. Especies como *Muriellopsis* sp. se han cultivado tanto en sistemas abiertos como en sistemas cerrados, con muy buenos rendimientos celulares y de luteína. Blanco et al. (2007), reportaron un cultivo de esta microalga en un reactor tipo" raceway" operado durante un año, en modo semicontinuo con valores de productividad de 8 g m^{-2} d^{-1} de biomasa seca y 30 mg m^{-2} d^{-1} de luteína, en invierno-otoño y 20 g m^{-2} d^{-1} de biomasa seca con 100 mg luteína m^{-2} d^{-1}, en verano. En el caso de esta microalga tres factores pueden contribuir al éxito de su cultivo en sistemas abiertos y son, su halotolerancia moderada (0.2 M NaCl), su capacidad de crecer a valores de pH elevados (9.5) y su rápido crecimiento bajo irradiaciones elevadas (30 MJ m^{-2} d^{-1}), características que no están presentes en todas las microalgas. Otra de las cepas con la que se han realizado estudios a mayor escala es *Scenedesmus almeriensis*, Molina et al. (2005), reportaron el diseño y operación de un reactor tubular de 28000 L de volumen de trabajo, con el cual obtuvieron productividades de luteína entre 0.36 g m^{-2} d^{-1} y 1 g m^{-2} d^{-1}.

Los reportes existentes sobre la producción heterotrófica de luteína por cepas del género *Chlorella* sp (Fernandez-Sevilla et al., 2010; Wei et al., 2008; Wu et al., 2007) establecen la posibilidad de aprovechar las ventajas del cultivo heterotrófico para la obtención de luteína.

Tabla 3. Producción de luteína por microalgas.

Especie	mg luteína g^{-1} biomasa	mg luteína L^{-1} d^{-1}	Condiciones de cultivo
Muriellopsis sp	5.5	0.8-1.4	Laboratorio, lote, 4-7 días, iluminación continua, 0.2 L[a]
	4.3	180 mg m^{-2} d^{-1}	Intemperie, reactores tubulares, cultivo continuo, 55 L[b]
Scenedesmus almeriensis	5.5	4.9	Laboratorio, cultivo continuo, ciclo circadiano, 2 L[c]
	4.5	290 mg m^{-2} d^{-1}	Intemperie, reactores tubulares, cultivo continuo, 4000 L[c]
Chlorella prothotecoides	4.6	10	Laboratorio, lote, heterotrofía, 16 L[d]
Scenedesmus incrassatulus	8.13*	1.098	Laboratorio, reactor airlift, lote alimentado, 2 L[e]

[a] Del Campo et al. (2000); [b] Del Campo et al. (2001); [c] Sánchez et al. (2008a); [d] Wei et al. (2008); [e] García-Cañedo et al. (2016).

*Valor calculado a partir de los datos presentados en el respectivo reporte científico.

Aplicaciones de la luteína en la alimentación animal

Se puede decir que las áreas de mayor desarrollo que emplean biomasa de microalgas como fuente de proteínas, son la acuicultura y la avicultura (Kebede-Westhead et al., 2006). Según reportes de SAGARPA (CGCS 2010B487), México se ubicó en el año 2009 como el quinto productor mundial de pollo con 2.7 millones de ton, y el principal consumidor de huevo fresco con un índice *per capita* anual de 22.4 kg; la actividad avícola constituye el 63% de la producción pecuaria nacional, distribuida en 34% pollo, 29.1% huevo y 0.2% pavo. La producción avícola nacional se concentra en un número reducido de empresas, entre las que sobresalen Industrias Bachoco S.A. de C.V., Pilgrim´s Pride S.A. de C.V. y Tyson de México S.A. de C.V. De manera general, las grandes compañías productoras de pollo han enlazado todos los eslabones de la cadena productiva, desde producción hasta la comercialización y en la mayoría de los casos una de las líneas comprende la elaboración de alimento balanceado, tanto para la producción interna como para el abastecimiento de pequeñas granjas. Las fortalezas tecnológicas de la industria avícola mundial son el mejoramiento de razas y el desarrollo de alimentos que aseguren mayor productividad y calidad tanto de la carne como del huevo (Hernández and Vázquez, 1999).

Los pigmentos no polares (carotenos) no contribuyen a la pigmentación de aves de corral, mientras que las xantofilas se acumulan en los tejidos grasos, en la piel y en la yema de huevo mejorando la calidad organoléptica y nutricional de estos productos. El color, así como la intensidad del mismo, depende de diferentes factores como la fisiología de las aves, las condiciones de crianza, las características de la dieta y por la concentración y el tipo de xantofilas presentes en el alimento. Actualmente existe la necesidad de dirigir la producción agrícola y pecuaria mediante prácticas de producción orgánica, lo que limita el uso de aditivos sintéticos a los alimentos. Las xantofilas presentes en la yema de huevo son provistas por medio de la aplicación de plantas ricas en xantofilas como la alfalfa y el maíz. La luteína está presente en vegetales de hojas verdes y en los pétalos de algunas flores, unida a los ácidos grasos presentes; puede obtenerse a partir de los pétalos de las flores por un proceso de fermentación-extracción y de esta manera se encuentra disponible en el mercado tanto en forma libre como en su forma acilada. Por lo general, la luteína no se adiciona de manera

aislada a los alimentos de las aves sino mezclada con otras xantofilas como la zeaxantina, ya que esto mejora la apariencia de la yema de huevo, por otro lado se ha observado que la luteína se acumula en la yema de huevo en su forma libre, sin importar la manera en que es adicionada en las dietas de gallinas ponedoras, lo que convierte a la yema de huevo en una buena fuente de luteína para el hombre, tanto por su concentración como por su biodisponibilidad, aunque esto no está bien establecido todavía (Breithaupt, 2007; Wu et al., 2009).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Especies del género *Scenedesmus* poseen la capacidad de crecer heterotróficamente y han demostrado su potencial para la producción de metabolitos de interés comercial en cultivo autotrófico. En investigaciones de nuestro grupo de trabajo García-Cañedo et al. (2016) obtuvieron una concentración de biomasa de 4.05 g L^{-1} con un contenido específico de luteína de 8.13 mg g^{-1}, utilizando un sistema de cultivo autotrófico en lote alimentado. Sin embargo, las productividades de biomasa y luteína son muy bajas si se comparan con las reportadas para otras microalgas.

Así mismo, Urbina (2010) observó que en cultivo heterotrófico de *S. incrassatulus*, la producción de biomasa fue 41% y 24.2%, superior a la obtenida en cultivos autotrófico y mixotrófico respectivamente, pero su contenido de pigmentos disminuye hasta un 60% en oscuridad.

Investigadores como Ogbonna et al. (1997) estudiaron un sistema de cultivo en dos etapas para *Chlorella pyrenoidosa* y demostraron que es posible integrar las condiciones de heterotrofía/autotrofía para mejorar la producción de biomasa con contenidos de proteína y clorofila cercanos a los de cultivos netamente autotróficos.

JUSTIFICACIÓN

La luteína es un carotenoide utilizado para la pigmentación de tejidos animales, como aditivo alimentario y en la industria farmacéutica. La luteína no es sintetizada por el hombre, sin embargo, sí se encuentra en tejidos como la mácula lútea de la retina y la piel. Actualmente la fuente comercial de luteína es la flor de cempasúchitl o marigold (*Tagetes erecta L.*), sin embargo, la concentración de luteína en los pétalos de cempasúchitl es muy variable y puede llegar a ser menor al 0.03 %, por lo que su producción resulta económicamente poco favorable y demanda grandes extensiones de terreno. Las microalgas son una fuente alternativa de luteína con contenidos superiores al 0.5% de su peso seco.

Scenedesmus incrassatulus es una microalga clorofícea de agua dulce, con reconocidas aplicaciones biotecnológicas que van desde el tratamiento de aguas residuales (Jacome-Pilco et al., 2009), hasta la producción de lípidos (Arias-Peñaranda et al., 2013) y pigmentos carotenoides (García-Cañedo et al., 2016). A pesar de su gran potencial, las productividades alcanzadas por *S. incrassatulus* en cultivo autotrófico son relativamente bajas. El cultivo heterotrófico ofrece una alternativa para mejorar la producción de biomasa, pero su aplicación al crecimiento de *S. incrassatulus* disminuye considerablemente su contenido de pigmentos. Con base en lo anterior, se propuso el desarrollo de un sistema de cultivo en dos etapas heterotrófia/autotrofía para mejorar la productividad de biomasa y luteína en *Scenedesmus incrassatulus*, con el fin de aplicar esta biomasa en la suplementación de alimento para gallinas ponedoras y evaluar su efecto sobre la pigmentación de la yema de huevo.

HIPÓTESIS

La aplicación de un sistema de cultivo en dos etapas heterotrofía/autotrofía, mejorará la productividad de biomasa y de luteína de *Scenedesmus incrassatulus.*

La adición de la biomasa de *Scenedesmus incrassatulus* en la dieta de gallinas ponedoras, aumentará el valor nutricional y la pigmentación de la yema de huevo.

OBJETIVOS

GENERAL

Mejorar la productividad de biomasa de *Scenedesmus incrassatulus* mediante la utilización de un sistema de cultivo en dos etapas heterotrofía/autotrofía, para su utilización como fuente de pigmento en dietas de gallinas ponedoras.

ESPECÍFICOS

- Obtener un cultivo de alta densidad celular de *Scenedesmus incrassatulus* en condiciones heterotróficas.
- Aumentar el contenido específico de luteína en *S. incrassatulus* mediante fotoinducción.
- Determinar el efecto de la adición de biomasa de *S. incrassatulus* en dietas de gallinas ponedoras sobre el valor nutricional y la pigmentación de la yema de huevo.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPA MICROALGAL Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Todos los experimentos fueron conducidos con cultivos axénicos de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01 (Chlorophyceae) donada por el laboratorio de Hidrobiología Experimental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México. Los inóculos fueron cultivados en medio PCG (Perales, 2008), a 25 ± 2 °C con un flujo fotónico de 120 µmol de fotones m^2 s^{-1} y fotoperiodo 12-h luz/12-h oscuridad, provisto por lámparas de luz blanca (OSRAM DULUX L Daylight, Germany). Los cultivos fueron burbujeados con aire filtrado a través de una membrana de 0.22 µm, a un flujo de 0.5 vvm. Para los inóculos mixotróficos y heterotróficos se adicionó 1 g L^{-1} de glucosa al medio de cultivo. En heterotrofía los matraces Erlenmeyer fueron recubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz. Los cultivos fueron sincronizados mediante tres resiembras consecutivas previas al inicio de cada cinética.

MEDIO DE CULTIVO Y SELECCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

La formulación del medio de cultivo se realizó mediante el balance de masa de cada uno de los nutrientes de acuerdo con las ecuaciones 1 y 2 (Ordaz and Orozco, 1998). Se consideró la composición elemental media de la biomasa microalgal (Bumbak et al., 2011; Oh-Hama and Miyachi, 1992) y una concentración final de biomasa de 4 g L^{-1}. La glucosa se utilizó como fuente de carbono (C). Se evaluaron dos fuentes de nitrógeno urea y extracto de levadura (con un contenido de nitrógeno de 46.62 % y 10.9 % respectivamente), en cuatro tratamientos: 1) Urea; 2) Extracto de levadura; 3) Urea/Extracto de levadura; y 4) Urea+vitaminas. Todos los tratamientos se ajustaron para mantener una relación C/N de 8.6. Un factor de exceso de 0.5 fue aplicado a todos los nutrientes excepto a las fuentes de carbono y de nitrógeno; para evitar la limitación del crecimiento por cualquiera de estos elementos.

Ecuación 1.

$$Y = \%\ \text{elemento en el compuesto} / \%\ \text{elemento en la célula}$$

Ecuación 2.

$$\text{Compuesto } (g\ L^{-1}) = (\text{Biomasa } (g\ L^{-1}) / Y) * f$$

Donde Y es el rendimiento celular y f es un factor de exceso.

La composición del medio fue la siguiente (g L^{-1}): Glucosa 8.56; K_2HPO_4 0.631; NaCl 0.0046; $MgSO_4 7H_2O$ 0.383; $CaCL_2$ $2H_2O$ 0.0374; $FeSO_4$ $7H_2O$ 0.055; $ZnSO_4$ $7H_2O$ 0.0011; micronutrientes 1mL L^{-1} (g L^{-1}: H_3BO_3 2.86; $MnSO_4$ $7H_2O$ 2.5; $CuSO_4$ $5H_2O$ 0.079; Na_2MoO_4 0.021; $Co(NO_3)_2$ $6H_2O$ 0.0364). Una mezcla de cianocobalamina 0.008; riboflavina 0.008 y tiamina 0.2 (mg mL^{-1}) fue utilizada como stock de vitaminas. Las diferentes fuentes de nitrógeno se adicionaron en la siguiente concentración: 0.848 g L^{-1} de urea a los tratamientos 1 y 4; 3.628 g L^{-1} de extracto de levadura al tratamiento 2; y una mezcla de 0.424 y 1.814 g L^{-1} de urea y extracto de levadura, respectivamente, al tratamiento 3. La solución de glucosa y la solución de sales fueron esterilizadas por separado en autoclave a 121°C durante 15 min y las vitaminas fueron esterilizadas por filtración y adicionadas al momento de la inoculación del medio. Se inocularon Matraces Erlenmeyer de 1 L con 500 ml de medio de cultivo estéril al 10 % v/v con cultivos autotróficos de *S. incrassatulus.* Todos los cultivos fueron incubados en un agitador orbital a 37 °C y 200 rpm, en total oscuridad.

SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO Y TIPO DE INÓCULO

Se realizaron experimentos a 30 y 37 °C, con el fin de determinar la mejor temperatura para el cultivo heterotrófico de *S. incrassatulus*. Se evaluaron dos tipos de inóculos: autotrófico y heterotrófico para determinar la capacidad de *S. incrassatulus* de crecer en la oscuridad durante un periodo de tiempo prolongado. Los cultivos se operaron en lote alimentado para asegurar un tiempo de cultivo no menor a diez días. El volumen inicial de los cultivos fue 250 mL. La solución de alimentación fue medio de cultivo completo con 17.12 g L^{-1} de glucosa, fue adicionada por pulsos diariamente para mantener una concentración mínima de glucosa de 3 g L^{-1} en el medio de cultivo. Todos los cultivos fueron incubados con agitación orbital a 200 rpm en la oscuridad.

OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLUCOSA Y UREA EN EL MEDIO DE CULTIVO

Con el fin de optimizar la concentración inicial de glucosa y urea en el medio de cultivo para mejorar la productividad de biomasa de *S. incrassatulus* en condiciones heterotróficas, se utilizó un diseño compuesto central rotacional (DCCR) con dos variables independientes (n) y dos niveles. El componente factorial (2^2) del diseño, permite estimar todos los efectos de primer grado y el efecto de las interacciones entre variables. Los puntos axiales (2*2) y las repeticiones del punto central (5), permiten estimar los efectos cuadráticos y el error, con un total de trece unidades experimentales. En la Tabla 5 se presentan los valores codificados y reales de los niveles para las variables independientes. El paquete estadístico Design- Expert 8.0.6.1 (versión de prueba) fue utilizado para realizar la regresión múltiple de los datos obtenidos en el diseño experimental, el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis gráfico de los datos obtenidos.

Tabla 4. Niveles de las variables independientes

Variable	**Niveles**					
	-	α	-1	0	1	α
Glucosa	3.79		10	25	40	46.21
Urea	0.16		0.7	2	3.3	3.84

Todos los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 1 L con 500 mL de volumen de trabajo. Se utilizaron inóculos mixotróficos al 10% v/v. Los cultivos fueron incubados a 30 °C y 200 rpm. Las concentraciones de glucosa y urea obtenidas como óptimas en el diseño experimental fueron evaluadas en biorreactor.

CULTIVO EN BIORREACTOR: OPERACIÓN EN DOS ETAPAS HETEROTROFÍA/AUTOTROFÍA (FOTOINDUCCIÓN)

Se desarrollaron cinéticas de cultivo heterotrófico por lote y lote alimentado en un biorreactor (Bioflo New Brunswick) de tanque agitado con volumen nominal de 6 L. Las condiciones de cultivo fueron controladas como sigue: pH 7.5 ± 1; temperatura 30 ± 1 °C; flujo de aire 1 vvm, agitación de 100 a 350 rpm, para sostener una concentración de oxígeno disuelto mayor a 20% de saturación. Para los cultivos en lote el volumen inicial fue de 4.5 L y para el lote alimentado se partió de 3 L. Se utilizaron inóculos mixotróficos al 10% v/v. En la tabla 5 se presenta las condiciones evaluadas en biorreactor bajo los dos tipos de operación. Se adicionaron 0.5 mL de una solución de Antifoam C (Sigma) al 10%, para evitar la formación de espuma. Como solución de alimentación para el cultivo en lote alimentado se empleó el medio completo con 250 g L^{-1} de glucosa y 21.73 g L^{-1} de urea. El flujo de alimentación fue calculado a partir de los parámetros cinéticos (μ_{max}, K_s) obtenidos en las cinéticas de lote. Una vez consumida la glucosa los cultivos fueron transferidos a un fotobiorreactor airlift de 3 L para una fase de fotoinducción autotrófica. La iluminación fue provista por un panel de lámparas de luz blanca (OSRAM DULUX L Daylight, Germany) con una irradiación de 230 µmol de fotones m^2 s^{-1} en la superficie del fotobioreactor, durante un periodo continuo de 48-h.

Tabla 5. Concentraciones de glucosa y urea ensayadas en biorreactor.

Operación	**Glucosa g L^{-1}**	**Urea g L^{-1}**
Lote	10.6	1.37
	32.53	2.86
Lote alimentado	32.53	2.86

APLICACIÓN DE LA BIOMASA DE *S. incrassatulus* COMO FUENTE DE PIGMENTOS EN DIETAS DE GALLINAS PONEDORAS

Para la obtención de la biomasa se realizaron 3 lotes de cultivo en dos etapas heterotrofía/autotrofía, en garrafones de 10 L, operados como columna de burbujas, con un flujo de aire estéril de 1vvm. El pH de la solución de sales se ajustó a 3.5 con HCL 1N, antes de la esterilización, para que al mezclar todas las soluciones quedará cercano a 7.5. Para la etapa de fotoinducción, se empleó un reactor air lift de cara plana de 14 L, iluminado por seis lámparas de luz de día con un aporte individual de 110 ± 10 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. Una vez concluido el proceso la biomasa se cosecho, por centrifugación a 3500 rpm/20 min y se secó en una estufa a 70°C durante 16 h, la pasta seca fue molida para su adición en la formulación del alimento para las gallinas. En la tabla 6 se presenta el diseño experimental utilizado para la evaluación de la biomasa de *Scenedesmus incrassatulus* como pigmentante en la dieta de gallinas ponedoras. Se emplearon gallinas de 36 semanas de edad, con un consumo diario de alimento de 110 g. En la tabla 7 se presenta la composición de la dieta base utilizada como alimento.

Tabla 6. Ensayo de adición de biomasa de *Scenedesmus incrassatulus* en dietas de gallinas ponedoras como fuente de pigmento.

	Tratamiento 1 (Control)	**Tratamiento 2**	**Tratamiento 3**
Fuente de pigmentos	Ninguno	Pigmento comercial	Microalga 1% (5ppm Luteína)
Animales por unidad experimental	5	5	5
# Réplicas	3	3	3
Animales por tratamiento	15	15	15
Tiempo de alimentación	3 semanas	3 semanas	3 semanas
Cantidad de biomasa	-----	-----	346.5 g de biomasa seca

Tabla 7. Composición de la dieta base para la alimentación de gallinas. Determinada en el departamento de Alimentación Animal del Colegio de Postgraduados.

	Cantidad (g $100g^{-1}$ de alimento)
Sorgo	65.043
Pasta de Soya (48)	21.842
Aceite crudo	1.436
Metionina	0.291
Lisina	0.000
Treonina	0.046
Triptófano	0.000
$CaCO_3$ (38%)	10.059
FOSFATO (18/21)	0.483
Vitaminas	0.300
Sal	0.350
Total	100.000

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Análisis de la biomasa

El peso seco (PS) de la biomasa y el contenido de pigmentos fotosintéticos fueron monitoreados diariamente en todos los experimentos. El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* se realizó diariamente a los cultivos en reactor. Se determinó el contenido de luteína y lípidos en los cultivos en reactor al final del crecimiento heterotrófico y después de la fotoinducción. El análisis químico proximal de la biomasa se realizó previo al ensayo de adición de biomasa como fuente de pigmento. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El PS se determinó de acuerdo con Hernandez-Zamora et al. (2014). Para la extracción de pigmentos fotosintéticos se empleó el protocolo reportado por Hernández-Zamora et al., (2014) en muestras de cultivo previamente diluidas para quedar en un rango

de 0.5-0.7 de absorbancia medida a 680 nm. La concentración de clorofila *a* y *b* y carotenoides totales se calculó empleando a las ecuaciones de Lichtenthaler and Buschmann (2001). La fluorescencia emitida por la clorofila *a* se midió con un fluorómetro portátil HANDY-PEA (Hansatech Instrument Ltd., Norfolk, UK) acoplado a una cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK). Las muestras se ajustaron por dilución a una densidad óptica aproximada de 0.3 $_{680\ nm}$ con medio PCG + 0.1 % de glucosa. Posteriormente se incubaron en la oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente (25 °C), luego las muestras fueron irradiadas por 1 s con luz roja $_{660\ nm}$ saturante (3000 µmol foton. m^{-2} s^{-1}). Los valores obtenidos fueron guardados automáticamente por el equipo y posteriormente interpretados mediante el Handy-PEA software desarrollado por Hansatech Instrument Ltd., U.K., y el software Biolayzer-HP3 diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo luz verde. Para la determinación del contenido de luteína las muestras de biomasa se liofilizaron y los pigmentos fueron extraídos de acuerdo con el método de la AOAC modificado, reportado por García-Cañedo et al. (2016). Tres mililitros del extracto fueron evaporados bajo atmósfera de nitrógeno y resuspendidos en 0.5 mL de metanol. Se inyectaron cuarenta microlitros de muestra concentrada en un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer Series 200 con detector UV-DAD. La separación se llevó a cabo con una columna Cogent HPLC C_{30} (5 µm x 200 A; 150 mm x 4.6 mm DI). Se utilizó una fase movil binaria con 78% A y 22% B. A, estaba compuesta por metanol:metil terbutil eter:H_2O en una proporción (81:15:4) y B, por metanol:metil terbutil eter:H_2O (6:90:4). El flujo de elución fue 0.5 ml min^{-1}, a una temperatura de 30 °C. La detección fue realizada a 445 nm. La identificación y cuantificación de luteína se hizo con base a un estandar de Sigma-Aldrich. El índice de intensidad visual de la yema se determinó con un colorímetro Kónica Minolta® CR-100. Se examinaron 15 muestras por semana. La extracción de pigmentos de la yema de huevo se realizó siguiendo el protocolo reportado por Leeson and Caston (2004); 4 mL del extracto se evaporaron y resuspendieron en 0.4 mL de metanol, para su inyección en el HPLC. El análisis químico proximal fue realizado por un laboratorio externo de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas vigentes.

Determinación de la concentración de sustratos

La concentración de sustratos se monitoreó diariamente en todos los experimentos. Para la determinación de la concentración de glucosa, muestras filtradas del cultivo se diluyeron para quedar en un rango de 1-3 g L^{-1} de glucosa y se midieron directamente con un glucómetro digital (Accu-Check, Roche®). La concentración de urea en el medio se determinó colorimétricamente a 420 nm, de acuerdo con la técnica de Yatzidis et al. (1964): Una muestra de sobrenadante de cultivo se diluyó 1/5. Se tomaron 2mL de la dilución anterior, se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Ehrlich y se mezclaron con vortex. Se midió la absorbencia de la muestra contra un blanco preparado con agua destilada. El cálculo de la concentración de urea se hizo con base en una curva patrón con concentraciones entre 0.05 g L^{-1} y 2.5 g L^{-1}.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por lo menos con dos réplicas. En el análisis estadístico de los datos se aplicó el análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) y la prueba de Tukey ($P< 0.05$) en el paquete estadístico Sigma Plot (versión 12.3).

MODELO DE CRECIMIENTO

Para describir el crecimiento heterotrófico de *S. incrassatulus* los datos experimentales fueron ajustados al modelo de Andrews:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

(Ecuación 3)

Donde μ es la tasa específica de crecimiento (días $^{-1}$), S es la concentración de sustrato (g L^{-1}) y K_s y K_i son constantes. Las ecuaciones de Shi et al. (1999), fueron empleadas para calcular

la concentración óptima de sustrato S_{mi} (g L^{-1}) en la cual se obtiene la mayor velocidad de crecimiento μ_{mi} (días^{-1}) en condiciones de inhibición:

$$\mu_{mi} = \mu_{max} / 1+2\sqrt{K_s/K_i}$$

(Ecuación 4)

$$S_{mi} = \sqrt{K_s/K_i}$$

(Ecuación 5)

El software Model Maker de libre acceso, se utilizó para simular el comportamiento de los datos y para calcular el valor de los parámetros cinéticos.

RESULTADOS Y DISCUSION

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO DE *Scenedesmus incrassatulus*

El medio de cultivo se diseñó teniendo en cuenta la composición elemental de la biomasa de *Scenedesmus* spp. reportada por Oh-Hama y Miyachi (1992), con una estequiometria molar de $CO_{0.32}H_{0.14}N_{0.11}P_{0.02}K_{0.02}Mg_{0.009}$, la cual se muy similar a la empleada en la formulación de medios de cultivo para *Chlorella vulgaris* (Bumbak et al., 2011). La solución de micronutrientes se modificó a partir de la solución A_5 la cual se ha empleado para el cultivo heterotrófico de *Chlorella*.

En la tabla 8 se compara la composición de diferentes medios de cultivo empleados para el cultivo heterotrófico de *S. incrassatulus*. Como se puede observar, la concentración de fosfato, magnesio, zinc, manganeso y cobre es baja en comparación a la del medio diseñado estequiométricamente (MSH) y esto puede limitar la obtención de altas densidades celulares en dichos medios. El medio MSH, fue formulado considerando una concentración mínima de biomasa de 4 g L^{-1}, sin embargo, se alcanzaron concentraciones mayores a 5 g L^{-1}, que superan lo reportado para los otros medios.

Tabla 8. Medios de cultivo empleados para el crecimiento heterotrófico de *S. incrassatulus.*

Compuesto	**Medio PCG [a]**	**Medio ET1 [a]**	**Medio ET2 [a]**	**Medio MSH**
	g L^{-1}	**g L^{-1}**	**g L^{-1}**	**g L^{-1}**
Glucosa	1,2	10	20	8,56
K_2HPO_4	0,04	0,3	0,3	0,63
NaCl	0,025	---	---	$4,6x10^{-3}$
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0,03	0,3	0,3	0,38
$CaCl_2.\ 2H_2O$	----	0,03	0,03	0,037
$FeSO_4.\ 7H_2O$	0,05	0,03	0,03	0,05
$NaNO_3$	0,25	---	2	---
$Ca(NO_3)_2$	0,03	---	---	---
Urea	---	---	2	0,42
Extracto de levadura	---	1	---	1,81
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	$1,437x10^{-4}$	$1,437x10^{-4}$	$1,437x10^{-4}$	$1,1x10^{-3}$
H_3BO_3	$3,092x10^{-4}$	$3,092x10^{-4}$	$3,092x10^{-4}$	$2,86x10^{-3}$
$MnSO_4.\ 7H_2O$	$1,183x10^{-4}$	$1,183x10^{-4}$	$1,183x10^{-4}$	$2,5x10^{-3}$
$CuSO_4.\ 5H_2O$	$1,548x10^{-5}$	$1,548x10^{-5}$	$1,548x10^{-5}$	$7,9x10^{-5}$
Na_2MoO_4	$2,4x10^{-5}$	$2,4x10^{-5}$	$2,4x10^{-5}$	$2,1x10^{-5}$
$Co(NO_3)_2.\ 6H_2O$	$2,747x10^{-6}$	$2,747x10^{-6}$	$2,747x10^{-6}$	$3,6x10^{-5}$

[a.] Urbina, 2010

Tal como se muestra en la tabla 9, con el medio MSH se logró mejorar tanto la productividad como el rendimiento de *S. incrassatulus* en heterotrofía, indicando que el balance estequiométrico del medio de cultivo favorece el consumo de los nutrientes y el metabolismo de la microalga.

Tabla 9. Producción heterotrófica de *S. incrassatulus* en diferentes medios de cultivo.

Medio	Máxima concentración de biomasa ($g\ L^{-1}$)	Productividad ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$)	$Y_{x/s}$ ($g_{PS}/\ g_{glu}$)
PCG+ glucosa [a]	1.2	0.36	1
ET1[a]	4	1.33	0.4
ET2[a]	3.5	1.16	0.175
MSH	5.43 ± 0.15	2.350 ± 0.090	0.634 ± 0.017

[a]. Urbina 2010

De acuerdo con lo reportado por otros autores la concentración de nitrógeno y magnesio en el medio de cultivo, son los factores más determinantes sobre la producción de biomasa en microalgas (Mandalam and Palsson, 1998; Welter et al., 2013). Sin embargo, esto se ha estimado en cultivos autotróficos, donde el nitrógeno es indispensable para la síntesis de proteínas y el magnesio es un componente esencial del centro de reacción de los fotosistemas. En heterotrofía, el flujo de carbono y energía cambia y se activan diversas rutas biosintéticas, por lo que se puede esperar que aumente o disminuya la demanda de iones o biomoléculas utilizados como cofactores enzimáticos que pueden no ser tan relevantes en autotrofía. Los resultados presentados en este trabajo indican que además de los macronutrientes (C, N, P), micronutrientes como el Zn, Cu y el Mn, juegan un papel esencial para alcanzar altas densidades celulares en heterotrofía.

SELECCIÓN DE LA FUENTE DE N EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO DE *Scenedesmus incrassatulus*

El efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de pigmentos de *S. incrassatulus*, se evaluó en dos ensayos. En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos en el primer grupo de experimentos. El análisis de varianza (ANOVA) reveló que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la velocidad específica de crecimiento, sin embargo, el tratamiento YE registró el valor más bajo ($0.886 \pm 0.037\ h^{-1}$), lo que indica que el extracto de levadura se metaboliza más lentamente que la urea, debido a que la microalga debe hidrolizar los polipéptidos del extracto de levadura antes de consumirlos, esto requiere la síntesis de proteasas extracelulares e implica un gasto energético. Muchos autores concuerdan en que la hidrólisis de polímeros similares a las proteínas es el paso limitante en la degradación de materia orgánica disuelta en ambientes acuáticos (Mulholland and Lee, 2009). Por otra parte, la máxima concentración de biomasa se obtuvo con los tratamientos que contenían extracto de levadura (U+YE y YE), aunque el tratamiento YE tardó un día más en alcanzar la máxima concentración de biomasa. Esto demuestra que *S. incrassatulus* puede hidrolizar y consumir el extracto de levadura como fuente de nitrógeno y que la adición de extracto de levadura al medio de cultivo favorece su producción de biomasa. A pesar de que el extracto de levadura se consumió más lentamente que la urea, su presencia en el medio de cultivo aumentó 33% la concentración de biomasa, posiblemente porque las vitaminas u otros nutrientes aportados por el extracto de levadura benefician el crecimiento de *S. incrassatulus*.

Los resultados mostraron que YE y U+YE, tuvieron un efecto similar sobre el crecimiento de *S. incrassatulus*, sin embargo, con U+YE la productividad de biomasa fue casi el doble ($2.350 \pm 0.090\ g\ L^{-1}\ d^{-1}$) que con YE ($1.190 \pm 0.015\ 2.350 \pm 0.090\ g\ L^{-1}\ d^{-1}$) como única fuente de nitrógeno, lo que indica un efecto sinérgico entre las dos fuentes de nitrógeno como también lo han reportado Wen y Chen (2001). De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, con la mezcla U+YE se obtuvo una mayor concentración de biomasa en comparación con U como única fuente de nitrógeno y se disminuyó el tiempo de crecimiento frente al tratamiento YE mejorando la productividad, esto demuestra que la utilización de fuentes de nitrógeno complejas como el extracto de levadura solas o en combinación con

otras fuentes de nitrógeno, puede favorecer el crecimiento de las microalgas ya que además de N aportan vitaminas y factores de crecimiento que favorecen su desempeño metabólico.

Tabla 9. Crecimiento y producción de pigmentos de *S. incrassatulus* en cultivo heterotrófico con diferentes fuentes de nitrógeno en matraz. U-urea, YE- extracto de levadura, U+YE- urea + extracto de levadura. Para todos los tratamientos la concentración inicial de glucosa fue de 8.3 g L^{-1}. Se presentan el promedio y el error estándar (n=4). Los resultados significativamente diferentes en cada tratamiento con $P < 0.05$ de acuerdo con el test ANOVA de una vía, se indican con superíndices distintos.

Fuente de nitrógeno	**Biomasa**		**μ (d^{-1})**	**Pigmentos fotosintéticos***	
	Máxima concentración (g L^{-1})	**Productividad (g $L^{-1}d^{-1}$)**		**Clorofila total (a+b) (mg g DW^{-1})**	**Carotenoides totales (mg gDW^{-1})**
U	4.04 ± 0.12^{a}	1.700 ± 0.060	0.921 ± 0.014^{a}	1.721 ± 0.153	0.788 ± 0.074
YE	5.30 ± 0.08^{b}	1.190 ± 0.015	0.886 ± 0.037^{a}	2.303 ± 0.064	0.058 ± 0.008
U+YE	5.43 ± 0.15^{b}	2.350 ± 0.090	1.00 ± 0.034^{a}	2.719 ± 0.085	0.023 ± 0.006

*Valor obtenido al final de la fase de crecimiento exponencial.

Por otra parte, la concentración celular obtenida en los tres tratamientos evaluados fue superior a la máxima concentración de biomasa, reportada para cultivos de *S. incrassatulus* creciendo en autotrofía (0.7 – 0.81 g L^{-1}), mixotrofía (0.92 – 1.8 g L^{-1}) y heterotrofía (1.2 – 2.02 g L^{-1}) (Arias-Peñaranda et al., 2013; Urbina, 2010). Con el tratamiento U+YE la productividad de biomasa obtenida fue 30.5, 29.4 y 6.5 veces mayor a la reportada para autotrofía, mixotrofía y heterotrofía respectivamente, aunque la velocidad de crecimiento de *S. incrassatulus* fue similar a la reportada por Urbina (2010), para cultivos heterotróficos de

esta microalga (1.032 d^{-1}). Estos resultados demuestran que el cultivo heterotrófico permite mejorar la productividad de *S. incrassatulus* y que a través de la optimización de los componentes del medio de cultivo se logra incrementar considerablemente la concentración de biomasa lo que hace posible alcanzar altas densidades celulares de esta microalga, tal como se ha reportado para otras especies de clorofíceas y diatomeas (De Swaaf et al., 2003; Doucha and Lívanský, 2012).

Con respecto a los pigmentos fotosintéticos, en heterotrofía el contenido de clorofilas y carotenoides de *S. incrassatulus*, disminuyó hasta un 90 % con respecto a lo reportado para cultivos autotróficos de esta microalga, 34.31 mg Chl g DW^{-1} y 6.32 mg Car g DW^{-1} respectivamente (Urbina, 2010). De esta manera, la concentración de clorofila total al final de la fase de crecimiento exponencial varió entre 1.7 y 2.7 mg Chl g DW^{-1}. En todos los tratamientos se presentó una ligera recuperación, alcanzando, 2.017 ± 0.147 mg Chl g DW^{-1} con U, 5.328 ± 0.378 mg Chl g DW^{-1} con YE y 5.854 ± 1.376 mg Chl g DW^{-1} con U+YE, entre los días 4 y 5 de cultivo. Los carotenoides presentaron un comportamiento similar al de las clorofilas, disminuyendo su concentración durante los primeros días de cultivo, en el caso de la U como única fuente de nitrógeno el valor más bajo se registró a las 24 horas de cultivo y fue 0.450 ± 0.132 mg Car g DW^{-1}, para el YE y la mezcla U+YE el contenido de carotenoides disminuyó hasta 0.058 ± 0.008 y 0.023 ± 0.006 mg Car g DW^{-1} a las 48 horas de cultivo, respectivamente. Posteriormente, en todos los tratamientos, se presentó una recuperación en el contenido de carotenoides totales. Con U el máximo valor fue 1.3 ± 0.102 mg Car g DW^{-1}, al tercer día de cultivo; en el caso del YE y la mezcla U+YE, los máximos valores se obtuvieron al quinto día de cultivo y fueron 1.97 ± 0.08 y 2.04 ± 0.31 mg Car g DW^{-1} para cada tratamiento. Aunque *S. incrassatulus* no pierde la capacidad para sintetizar clorofilas y carotenoides en oscuridad, su contenido es muy bajo con respecto a cultivos iluminados, por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos, la disminución heterotrófica de los pigmentos fotosintéticos se da en dos etapas, inicialmente se presenta una caída drástica en la concentración de clorofilas y carotenoides que puede estar relacionada con los cambios bioquímicos y estructurales desencadenados por la carencia de luz en el cultivo y la presencia exógena de glucosa (Lee, 2004; Tabei et al., 2012) posteriormente se presenta una fase de estabilización en la cual el contenido de pigmentos

aumenta ligeramente, este comportamiento puede indicar la preparación de las células para responder a una eventual exposición a la luz y puede ser parte de las estrategias de adaptación al crecimiento heterotrófico por parte de *S. incrassatulus*.

Por otra parte, las máximas concentraciones de clorofila y carotenoides fueron obtenidas en el medio con U+YE (5.854 ± 1.376 mg Chl g DW^{-1} y 2.04 ± 0.31 mg Car g DW^{-1}), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas con el medio YE (5.328 ± 0.378 mg Chl g DW^{-1} y 1.97 ± 0.08 mg Car gDW^{-1}). Lo anterior indica que alguno o varios de los nutrientes aportados por el extracto de levadura favorecen la estabilización metabólica de *S. incrassatulus* en heterotrofía. Esto se refleja en la recuperación parcial del contenido de pigmentos fotosintéticos, principalmente de carotenoides, y permite a la microalga adaptarse rápidamente ante un cambio repentino a condiciones de iluminación. Debido a la complejidad del extracto de levadura, no se puede determinar con precisión su efecto sobre el metabolismo de *S. incrassatulus.* Sin embargo, la recuperación del contenido de carotenoides de *S. incrassatulus* puede ser el resultado de un estímulo sobre la expresión de enzimas claves en la ruta de biosíntesis de carotenoides, ya que existen evidencias de que los niveles de carotenoides en etioplastos pueden ser aumentados si se estimula la expresión de fitoeno sintasa (*PSY*) la primera enzima clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides, mediante la adición de cofactores o promotores de crecimiento (Rodriguez-Villalon et al., 2009).

Dado que la mejora en la productividad de biomasa y en el contenido de pigmentos fotosintéticos en presencia del extracto de levadura, pudo ser producida por las vitaminas aportadas por este, se realizó un segundo grupo de experimentos para evaluar el crecimiento de *S. incrassatulus* en urea como fuente de nitrógeno con adición de vitaminas (U+V), utilizando la mezcla U+YE como control. Se seleccionaron vitaminas hidrosolubles del complejo B, recomendadas por sus efectos positivos sobre el crecimiento y la producción de pigmentos en microalgas. Su concentración se fijó de acuerdo con lo reportado por (Croft et al., 2006; Desouky, 2011; Watanabe, 2005). En la figura 4, se presenta la cinética de crecimiento y consumo de glucosa de *S. incrassatulus* para el segundo conjunto de experimentos (U+V), así como el contenido específico de pigmentos para cada tratamiento.

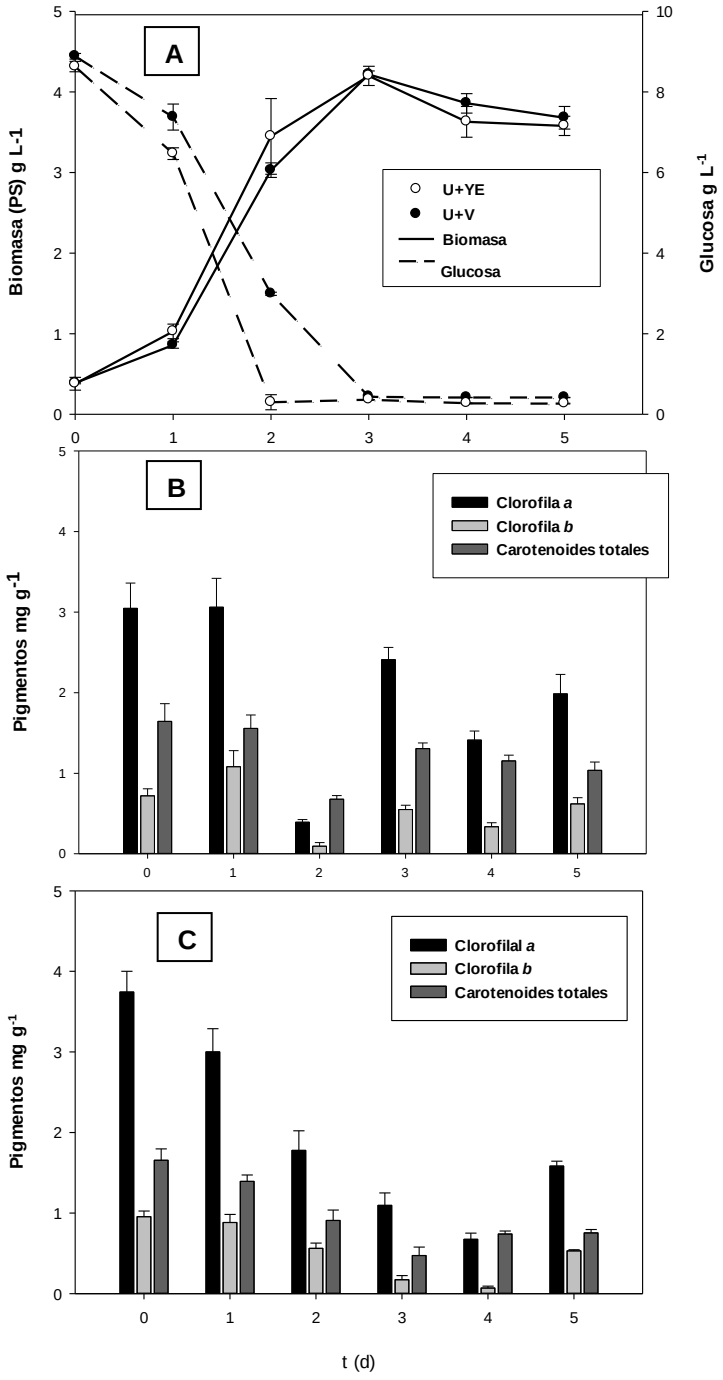


Figura 4. Cinética de crecimiento y producción de pigmentos de *S. incrassatulus* en heterotrofía. A. Crecimiento y consumo de glucosa. B. Contenido específico de pigmentos en el tratamiento Urea + Vitaminas. C. Contenido específico de pigmentos en el tratamiento Urea + Extracto de levadura.

Tanto para el tratamiento U+YE como para el tratamiento U+V, la fase de crecimiento exponencial fue de 48 h, con una velocidad específica de crecimiento de $1.109 \pm 0.038\ d^{-1}$ y $1.025 \pm 0.002\ d^{-1}$, respectivamente. La máxima concentración de biomasa se alcanzó al tercer día de cultivo con $4.22 \pm 0.05\ g\ L^{-1}$ para U+YE y de $4.2 \pm 0.16\ g\ L^{-1}$ para U+V. La prueba de ANOVA reveló que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos tratamientos para la máxima concentración de biomasa (P=0.889) y la velocidad específica de crecimiento (P=0.158). Lo anterior confirma que el efecto sinérgico de la mezcla U+YE está relacionado con el aporte de factores de crecimiento ya que reemplazando el extracto de levadura por una solución de vitaminas se obtienen resultados similares, con la ventaja de que se trabaja con un medio definido. Con respecto al contenido de pigmentos fotosintéticos, en los dos tratamientos se presentó una disminución en el contenido de clorofilas y carotenoides, sin embargo en el tratamiento U+YE la disminución fue gradual y solo se pudo observar una ligera recuperación hasta el final del cultivo, mientras que en el medio con U+V, la disminución fue súbita después del segundo día de cultivo y se presentó una recuperación casi inmediata del contenido de pigmentos, principalmente de carotenoides, que se mantuvo hasta el final del cultivo. Este comportamiento puede ser explicado con base en lo observado para el primer conjunto de experimentos, ya que en todos los casos se presenta la disminución en el contenido de pigmentos como una respuesta a la ausencia de luz y posteriormente la recuperación parcial de dicho contenido, como consecuencia de una posible estabilización metabólica. Los resultados demuestran que la estabilización metabólica es favorecida por la presencia de vitaminas en el medio de cultivo, sobre todo cuando estas están más disponibles, por esta razón en el medio U+V, la recuperación en el contenido de pigmentos fue más rápida. No existen evidencias de que las vitaminas promuevan la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides, pero algunos estudios han demostrado que las vitaminas del complejo B, no solo actúan como cofactores de diferentes carboxilasas y transferasas, sino que tiene un papel antioxidante frente a factores de estrés, en diferentes organismos (Asensi-Fabado and Munne-Bosch, 2010). En las microalgas la tolerancia al estrés oxidativo, promovida por las vitaminas, está directamente relacionada con un aumento en la producción de pigmentos fotosintéticos (Desouky, 2011), aunque el mecanismo no está descrito, los resultados demuestran que esta respuesta se mantiene aún en heterotrofía.

La urea y el extracto de levadura son dos fuentes de nitrógeno que se han empleado en el cultivo heterotrófico de microalgas (Doucha and Lívanský, 2012; Heredia-Arroyo et al., 2010; Shen et al., 2009; Shen et al., 2010; Wen and Chen, 2001; Xiong et al., 2008). Existen muy pocos reportes sobre la conveniencia de diferentes fuentes de nitrógeno para cepas del género *Scenedesmus* en heterotrofía. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la urea es la fuente de nitrógeno más adecuada para el crecimiento heterotrófico de *S. incrassatulus* ya que favorece su velocidad de crecimiento y disminuye la pérdida de pigmentos fotosintéticos en su biomasa, principalmente carotenoides, tal como lo reportó Urbina (2010), al comparar la urea y el nitrato de sodio ($NaNO_3$) como fuentes de nitrógeno para *S. incrassatulus*. Por otra parte, Ren et al. (2013), reportaron que el $NaNO_3$ resultó ser la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento heterotrófico de *Scenedesmus* sp., comparado con la urea y el extracto de levadura. Se ha demostrado que cepas de la misma especie pueden ser favorecidas por diferentes fuentes de nitrógeno (Shen et al., 2010; Shi et al., 2000; Xiong et al., 2008). No se conocen los mecanismos bioquímicos relacionados con la preferencia de una u otra fuente de nitrógeno por las microalgas y no se puede atribuir a una característica taxonómica, por lo que es necesario evaluar cuál es la fuente de nitrógeno más adecuada para una especie en particular bajo las condiciones de cultivo que se implementen. Por otra parte, las microalgas también requieren de vitaminas u otros cofactores para mejorar su crecimiento. Tal como lo muestran los resultados, *S. incrassatulus* puede crecer sin una fuente externa de vitaminas, pero su crecimiento se ve favorecido con su presencia en el medio de cultivo, ya sea a partir de un sustrato complejo como el extracto de levadura o por la adición de vitaminas específicas al medio de cultivo. Se ha demostrado que existe auxotrofía por algunas vitaminas como cobalamina, tiamina y biotina (Croft et al., 2006), las cuales pueden ser obtenidas por las microalgas a partir de una relación simbiótica con bacterias (Grant et al., 2014), en muchos casos la dependencia de estos cofactores no es total, pero su presencia favorece el crecimiento de las microalgas en condiciones adversas (Desouky, 2011). Cuando las microalgas se encuentran en cultivo axénico, la adición de vitaminas al medio de cultivo puede ser determinante para su crecimiento (Bumbak et al., 2011).

ESTABLECIMIENTO DE UN INOCULO HETEROTRÓFICO

Con el fin de mejorar la productividad de *S. incrassatulus,* se planteó utilizar un inóculo adaptado a la oscuridad, después del proceso de adaptación (9 días en la oscuridad), se inocularon matraces que contenían el medio seleccionado en la etapa anterior para el crecimiento heterotrófico de *S. incrassatulus*, los cultivos se monitorearon durante 3 días, pero no se observó crecimiento ni consumo de glucosa (datos no mostrados). Estos resultados contrastan con lo reportado en otros trabajos (Abeliovich and Weisman, 1978; Doucha and Lívanský, 2012; Shen et al., 2010), donde la adaptación de diferentes cloroficeas a la heterotrofía, aumenta su velocidad de crecimiento, sin embargo, en el caso de *S. incrassatulus* se observó una pérdida completa de su capacidad para crecer en heterotrofía, esto puede indicar una condición de crecimiento heterotrófico-dependiente de la luz, tal como se ha reportado para diferentes especies de cianobacterias y está bien caracterizado en *Synechocystis* sp. (Anderson and McIntosh, 1991; Tabei et al., 2009); aunque no existen reportes directos sobre este fenómeno en microalgas eucariotas, Xiong et al, (2008), suministraron una iluminación débil de 5 µmol fot. m^{-2} s^{-1}, durante el cultivo heterotrófico de *Chlorella prothotecoides*, estrategia similar a la utilizada para mantener el crecimiento heterotrófico dependiente de la luz en cianobacterias y nos da idea de que este mismo comportamiento se ha observado en microalgas eucariotas, aunque no se ha profundizado en su estudio.

Es necesario investigar de manera particular este comportamiento en *S. incrassatulus* para poder determinar si obedece a los mismos procesos de regulación encontrados en las cianobacterias y si las estrategias adoptadas en estos casos son convenientes para mejorar el crecimiento heterotrófico de *S. incrassatulus*. Para efectos de este trabajo se decidió utilizar inóculos mixotróficos, ya que se tienen antecedentes directos de sus ventajas para el crecimiento con respecto a la autotrofía (Urbina, 2010; (Flórez-Miranda, 2010)).

SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO

Para determinar el efecto de la temperatura de cultivo sobre el crecimiento y la producción de pigmentos de *S. incrassatulus* durante un periodo prolongado de tiempo, se llevaron a

cabo experimentos a 30°C y 37°C en lote alimentado por pulsos, manteniendo el volumen del cultivo constante. Se evaluaron estas dos temperaturas ya que las microalgas del género *Scenedesmus* son catalogadas como microorganismos mesófilos con óptimos entre 30°C y 40°C (Hodaifa et al., 2010; Sánchez et al., 2008b) y se desconoce si existe un efecto combinado entre la temperatura y el tiempo de cultivo sobre la capacidad de las microalgas para tolerar el crecimiento heterotrófico. En la figura 5, se presenta la cinética de crecimiento y consumo de glucosa de *S. incrassatulus,* en lote alimentado a 30 °C y a 37°C. La fase de alimentación se inició a los tres días, cuando la concentración de sustrato había disminuido casi un 60% de la concentración inicial. Mediante la prueba de ANOVA se determinó que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P= 0.364$) entre la concentración de biomasa alcanzada al final del lote para las condiciones evaluadas. Al término del lote alimentado la concentración de biomasa a 30°C fue 15% superior a la obtenida a 37°C ($P< 0.001$).

De acuerdo con los resultados, se puede decir que existe un efecto combinado entre la temperatura y el tiempo de cultivo sobre el crecimiento de *S. incrassatulus*, ya que durante los primeros días de cultivo no se observó diferencia en la producción de biomasa, pero conforme el tiempo avanzó se pudo observar que a 30°C se obtuvo un mayor crecimiento. Durante el régimen de alimentación, el crecimiento de la microalga tuvo un comportamiento lineal y la velocidad de crecimiento disminuyó casi 10 veces con respecto a la obtenida en el cultivo por lote. Sin embargo, el consumo permanente de la glucosa indica que la microalga mantuvo su metabolismo activo durante todo el cultivo. Durante la fase de crecimiento exponencial (lote), se presentó una disminución tanto de clorofilas como de carotenoides totales la cual fue más severa a 37°C que a 30°C. Después de 8 y 10 días de cultivo se presentó una recuperación total del contenido inicial de pigmentos en las células cultivadas a 30°C y 37°C respectivamente (Fig. 5).

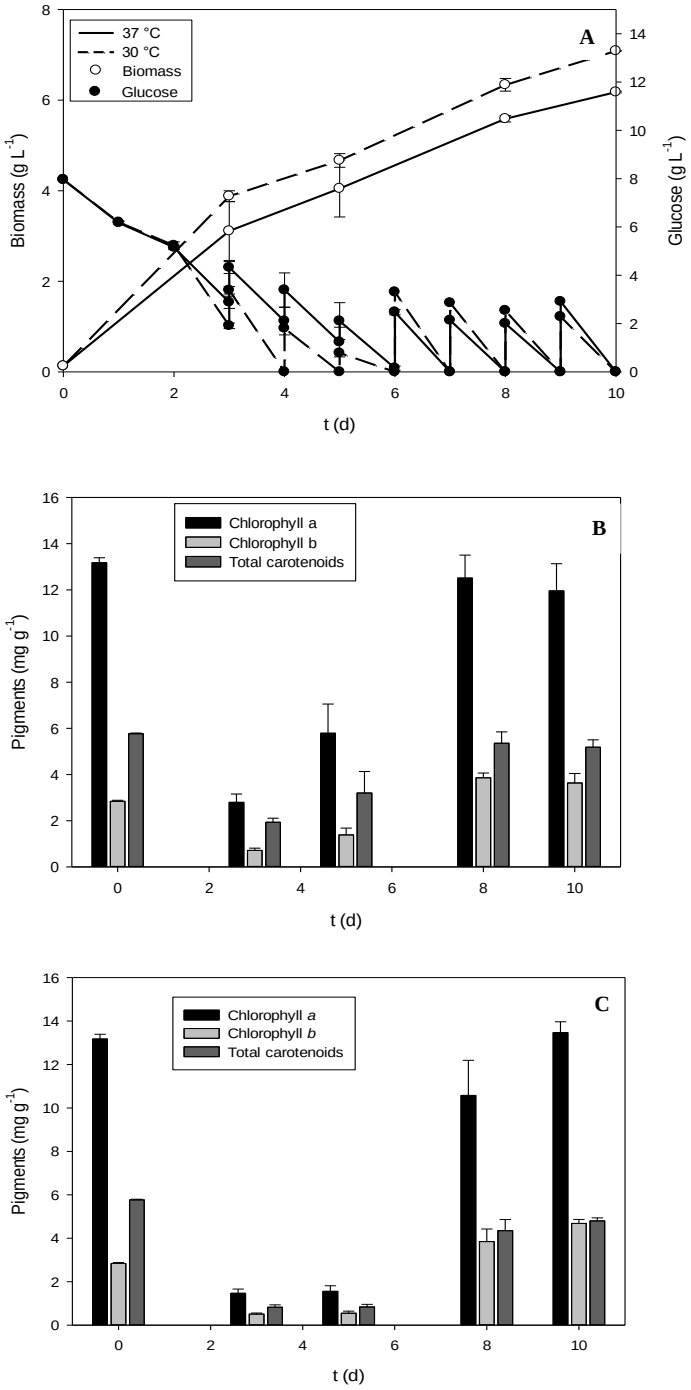


Figura 5. Crecimiento y producción de pigmentos de *S. incrassatulus* en lote alimentado en matraces. A. Crecimiento y consumo de glucosa. B. Contenido específico de pigmentos a 30°C. C. Contenido específico de pigmentos a 37°C. Se presenta la media y el error estándar (n=4)

Los resultados muestran que el crecimiento y la producción de pigmentos *S. incrassatulus* en heterotrofía se ven favorecidos a 30°C en comparación a 37°C, cuando el cultivo se lleva a cabo durante un periodo de tiempo prolongado (no menor a diez días). Esto puede ser evidencia de una respuesta fisiológica a una condición de estrés oxidativo. De esta manera, a medida que la temperatura disminuye dentro de los óptimos para el crecimiento, los mecanismos de protección celular son más estables y permiten alcanzar una mayor producción de biomasa. Estos resultados complementan lo observado en los experimentos anteriores y refuerzan la hipótesis de que la recuperación del contenido de pigmentos fotosintéticos está relacionada con una estabilización metabólica, promovida por la presencia de vitaminas en el medio de cultivo. Por esta razón, mediante la adición de medio completo a un cultivo de *S. incrassatulus*, mantenido en heterotrofía durante un periodo de tiempo prolongado, fue posible recuperar su contenido inicial de pigmentos.

CULTIVO EN BIORREACTOR DE *Scenedesmus incrassatulus*: HETEROTROFÍA/AUTOTROFÍA

Una vez establecida la fuente de nitrógeno (urea) y la temperatura de cultivo (30°C), se realizaron fermentaciones en lote en un biorreactor de tanque agitado, bajo condiciones controladas de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Con base en los cálculos para alcanzar una concentración de biomasa de 8 g L^{-1}, se utilizó una concentración inicial de glucosa de 12.195 g L^{-1} y la urea fue ajustada a 1.37 g $L^{-.1}$, para mantener una relación C/N de 7.6. En la figura 6, se presenta la cinética de crecimiento y consumo de sustratos de *S. incrassatulus* en reactor.

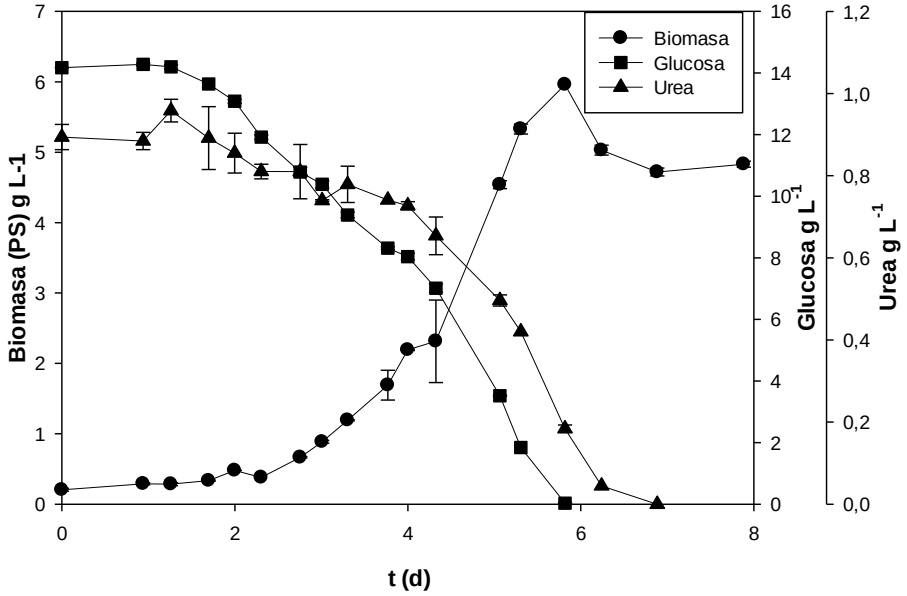


Figura 6. Crecimiento y consumo de sustratos de *S. incrassatulus* en biorreactor con dos propelas. Las barras de error representan la media ± error estándar de dos muestras independientes.

La máxima concentración de biomasa alcanzada fue de 6.16 ± 0.2 g L^{-1}, con una productividad de 1.04 ± 0.01 g L^{-1} d^{-1} y μ de 0.78 ± 0.018 h^{-1}. La concentración de biomasa obtenida fue 23% menor a la esperada de acuerdo con los cálculos (8 g L^{-1}) y la μ disminuyó 23.9 % con relación a la obtenida en cultivos en matraz (1.025 h^{-1}). El comportamiento anterior puede estar relacionado con el estrés hidrodinámico producido por la agitación mecánica durante el cultivo en reactor, resultados similares fueron reportados por Hodaifa et al. (2010) quienes concuerdan en que las condiciones de agitación en los reactores de tanque agitado producen daño celular en especies del género *Scenedesmus*, tal como ha sido reportado para otras microalgas (García Camacho et al., 2000). Sin embargo, de acuerdo con Leupold et al. (2013), microalgas como *Chlorella* y *Scenedesmus,* solo sufren daño considerable con la agitación a velocidades elevadas, ya que son morfológicamente más resistentes que otras especies. En las condiciones de cultivo ensayadas en este experimento, el estrés hidrodinámico fue alto ya que se utilizaron dos propelas para proveer la agitación dentro del reactor, por esta razón, se retiró una propela y se evaluó la respuesta de *S. incrassatulus.*

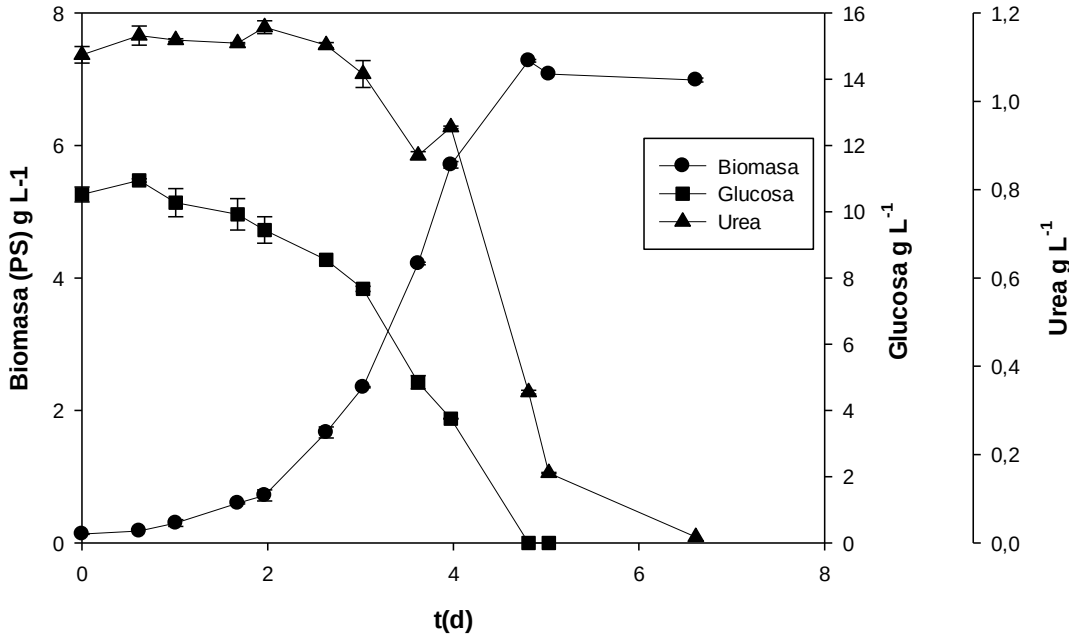


Figura 7. Crecimiento y consumo de nutrientes de *S. incrassatulus* en bioreactor operado con una sola propela. Se presenta la media ± error estándar de dos muestras independientes.

Al operar el reactor con una sola propela, la concentración de biomasa y la μ mejoraron 17.14 y 16.63 % respectivamente, lo que comprobó que la diferencia entre los resultados obtenidos en matraz y en reactor está relacionada con el régimen de agitación y que *S. incrassatulus* es capaz de tolerar condiciones moderadas de agitación en un reactor de tanque agitado (100-300 rpm; <1vvm). Por otra parte, durante las primeras cinéticas en lote en reactor, se observó que la productividad del cultivo fue menor que la obtenida en matraz y que en reactor el cultivo presentó una fase lag de aproximadamente 30 h (Figura 7). Esta fase de adaptación se relacionó directamente con la disminución del pH del medio de cultivo ya que al inicio de la cinética el valor del pH fue 8.5 y la fase de crecimiento inició cuando este valor disminuyó hasta 7.5 o menos. Con el ajuste de pH desde el inicio de la cinética a ~7.5 desapareció la fase lag y la productividad fue similar a la obtenida en matraces (1.4 g L^{-1} d^{-1}). Estos resultados son congruentes con otros reportes de cultivos heterotróficos (Bumbak, 2011) en los que se maneja un rango de pH entre 6.5 y 7.5 para el crecimiento de las microalgas, lo que supone un requerimiento fisicoquímico para el mejor desempeño de las enzimas involucradas en el metabolismo heterotrófico.

La máxima concentración de biomasa obtenida heterotróficamente en cultivo por lote en reactor fue 7.22 ± 0.06 g L^{-1} la cual supera 1.8 veces los reportado por García-Cañedo et al. (2016) para cultivos autotróficos en lote alimentado de esta microalga y en 4.1 veces lo obtenido al cultivar *S. incrassatulus* mixotróficamente en lote (Arias-Peñaranda et al., 2013). La productividad de biomasa obtenida fue de 1.48 ± 0.035 g L^{-1} d^{-1}, la cual es comparable con la reportada para *Chlorella protothecoides* cultivada en lote heterotrófico de 1.54 g L^{-1} d^{-1} (Shi et al. 1999).

Una vez consumida toda la glucosa el cultivo crecido heterotróficamente fue transferido a un fotobiorreactor multitubular airlift para evaluar el efecto de la fase de fotoinducción autotrófica sobre la producción de pigmentos. En la figura 8, se presenta el contenido de xantofilas totales y clorofila total durante el cultivo secuencial heterotrofía/fotoinducción (TSHP). De acuerdo con los resultados, durante el cultivo heterotrófico el contenido de pigmentos disminuyó hasta 55.8 % para las clorofilas y 85.5 % para las xantofilas con respecto al valor inicial y presentaron un comportamiento similar al observado para los cultivos en matraz. Al final de la fase heterotrófica el contenido de clorofilas totales fue de 21.2 ± 0.19 mg g^{-1} PS y el de xantofilas fue de 2.096 mg g^{-1} PS. Después de 24 h de fotoinducción, las clorofilas presentaron valores similares a los reportados para cultivos autotróficos (31.7 ± 1.32 mg g^{-1} PS) y las xantofilas tuvieron una recuperación de 82% del valor inicial (3.66 mg g^{-1} PS). Estos resultados demuestran que la adición de una etapa de fotoinducción, después del cultivo heterotrófico, permite recuperar el contenido de pigmentos fotosintéticos de *S. incrassatulus.*

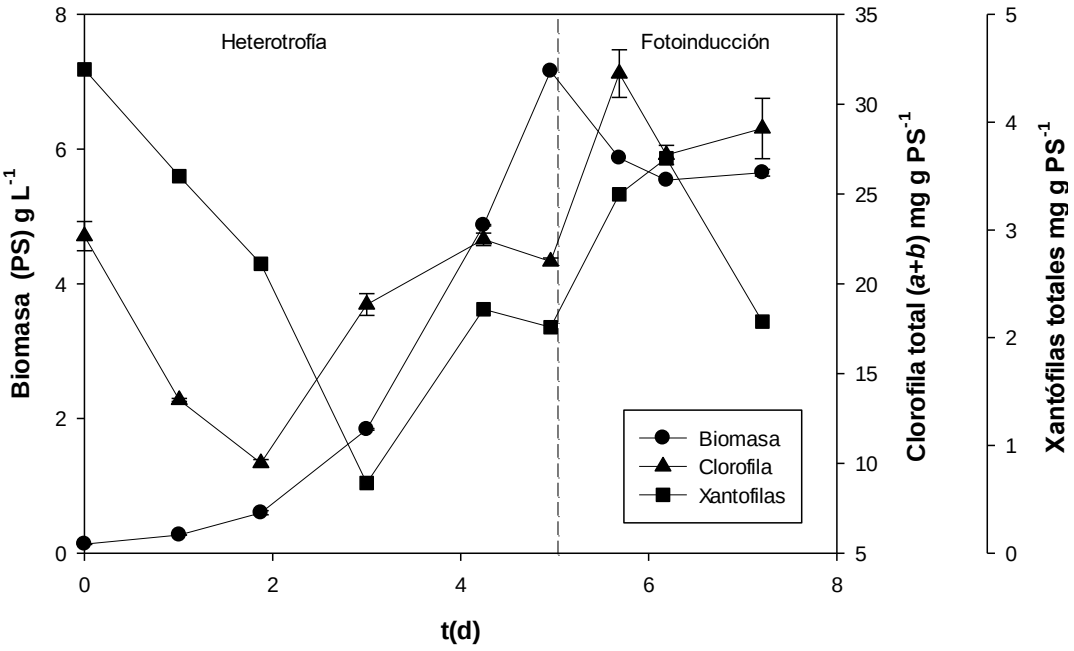


Figura 8. Cinética de crecimiento y producción de pigmentos de *S. incrassatulus* en el proceso de cultivo secuencial TSHP, con una concentración inicial de glucosa de 12.195 g L^{-1}. Se presenta la media ± error estándar de dos muestras independientes.

La mayor productividad de xantofilas totales fue de 3.33 mg L^{-1} d^{-1} después de 17 h de iluminación (Figura 9). La mayor productividad no correspondió a la mayor concentración de xantofilas en la biomasa, debido a que durante la etapa de inducción hay pérdida de biomasa lo que afecta la productividad. Los valores obtenidos para la productividad de xantofilas totales, son superiores a los reportados por Urbina (2010) para cada una de las condiciones evaluadas, mixotrofía, heterotrofía y autotrofía siendo 4.5, 11.89 y 10.4 veces mayor a cada una de estas. Fan et al. (2012) reportan un productividad de 3.36 mg L^{-1} d^{-1} para carotenoides totales, empleando un proceso secuencial para el crecimiento y la producción de lípidos por *Chlorella vulgaris*, si se tiene en cuenta que las xantofilas son una porción de los carotenoides totales, se puede concluir que nuestros resultados son comparables con lo reportado por otros autores, pero es necesario incrementar la productividad para hacer más atractivo el proceso.

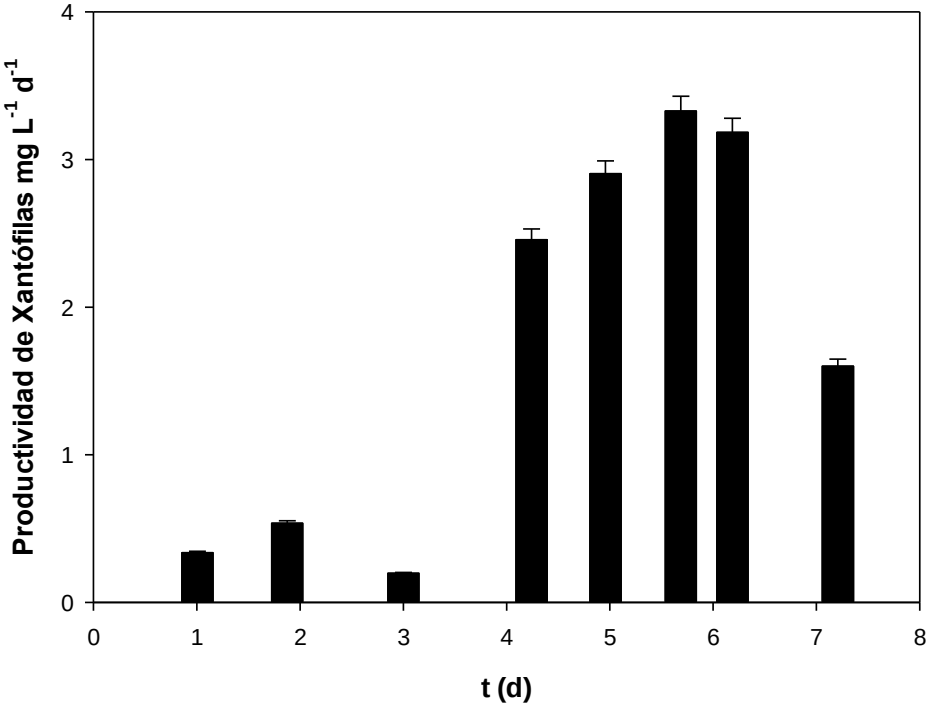


Figura 9. Productividad de xantofilas totales durante el proceso secuencial TSHP.

Análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila a

Mediante la prueba OJIP (Strasser and Strasser, 1995), se puede describir la actividad del PSII estableciendo el destino del flujo de energía que atraviesa su centro de reacción. Cuando un flujo de fotones es absorbido por los pigmentos de la antena fotosintética, parte de la energía es disipada como calor (DIo) y menor grado como fluorescencia emitida, la energía restante es canalizada como flujo atrapado al centro de reacción y transformada en energía redox para generar transporte de electrones en la figura 10, se esquematiza la derivación de los flujos.

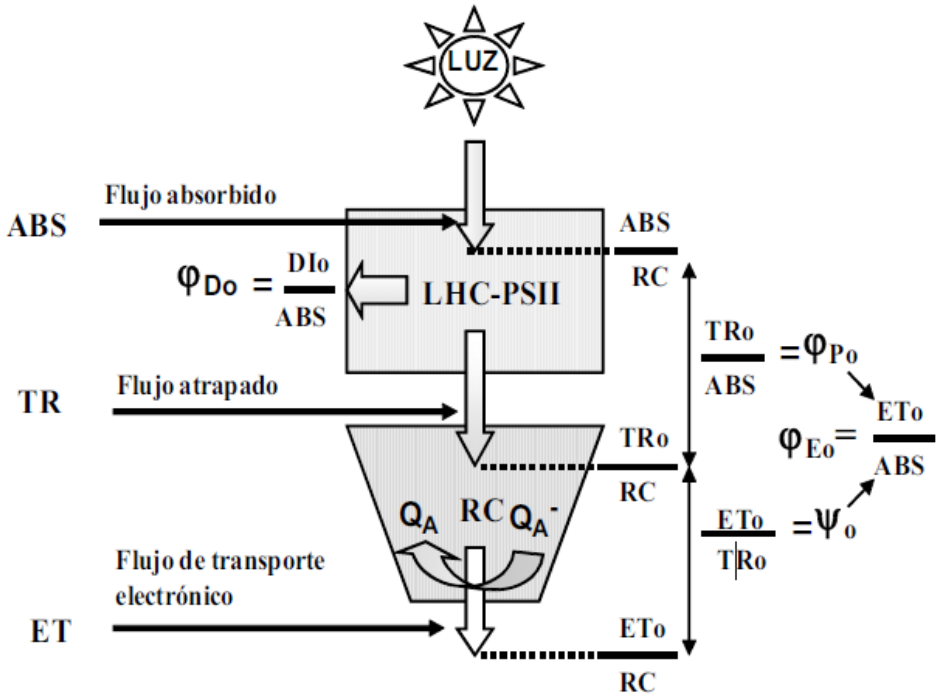


Figura 10. Derivación del flujo de energía en el aparato fotosintético.φPo, rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria, ψo, la eficiencia con la que un exitón atrapado puede mover un electrón más allá de QA^- en la cadena transportadora de electrones y φEo, la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones.

El rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria representa la máxima proporción de energía que puede ser atrapada a partir del flujo absorbido. Durante el cultivo TSHP este parámetro disminuyo en el transcurso de la fase heterotrófica y se restableció por completo a las 17 horas de inducción. ψo presentó el mismo comportamiento y esto se refleja finalmente en la eficiencia cuántica para el transporte electrónico, φEo (Figura 11).

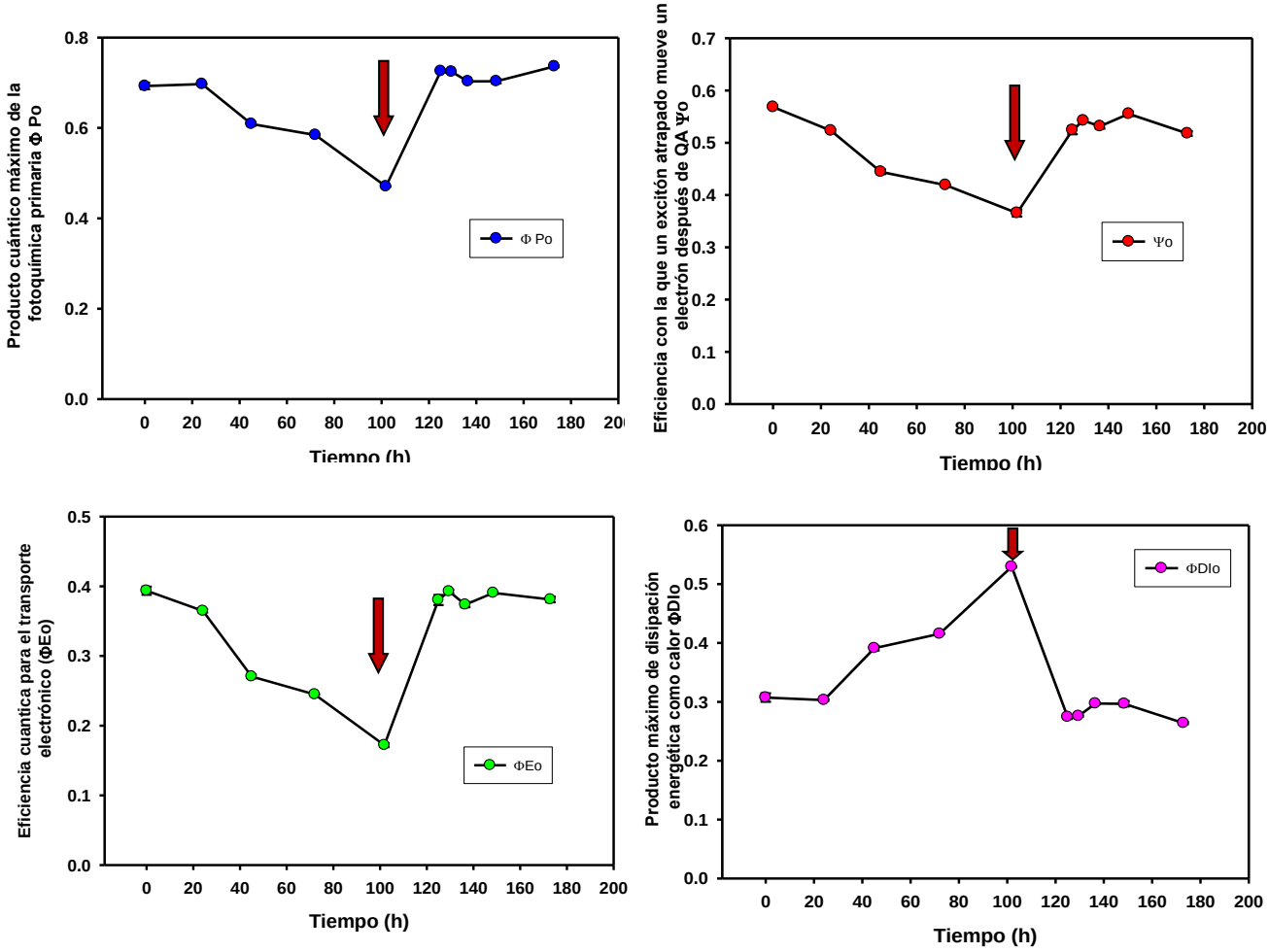


Figura 11. Análisis del flujo de energía durante el cultivo TSHP de *S. incrassatulus.* Las flechas rojas indican el final de la fase heterotrófica y el inicio de la fotoinducción.

La disminución en la eficiencia cuántica para el transporte electrónico durante la heterotrofía, indica que existe una inhibición parcial del proceso fotosintético, un comportamiento similar al presentado cuando hay fotoinhibición; es claro que en condiciones de obscuridad la célula no puede fotoinhibirse lo que indica que existe otro u otros factores que afectan la funcionalidad del PSII. El incremento en la disipación térmica φDIo de la energía absorbida por los complejos antena refleja la incapacidad para transferir la energía a los centros de reacción y de allí a la cadena transportadora de electrones, por lo que esta es liberada en forma de calor para evitar un daño irreversible del fotosistema. El restablecimiento de los

flujos de energía, una vez que el cultivo es transferido a la luz, indica que existe un mecanismo regulado por la luz que determina la funcionalidad del PSII.

Las gráficas de la cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* permiten visualizar el progreso de la emisión de la fluorescencia, conforme avanza el flujo de electrones a lo largo de la cadena, tal como se comentó antes cada una de las etapas de la curva OJIP está relacionada con uno de los componentes de la cadena transportadora de electrones y mediante la observación de estas gráficas se pueden identificar los puntos críticos en el funcionamiento del PSII. La gráfica de Δ evidencia aún más la variación en el flujo de electrones con respecto al control, las deficiencias y estímulos en el flujo de electrones, se observan como inflexiones por arriba y por debajo del control respectivamente.

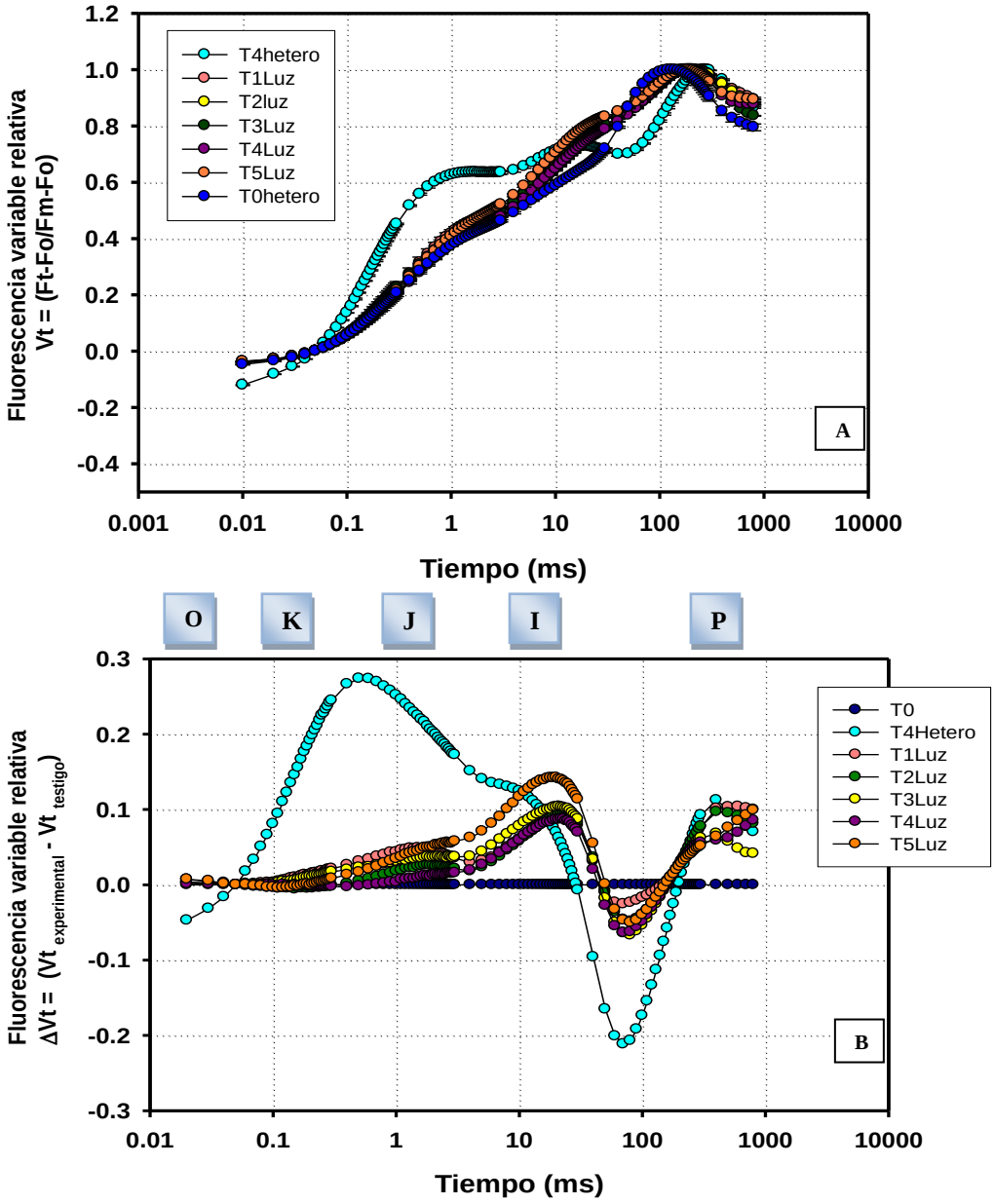


Figura 12. Cinéticas de fluorescencia de la clorofila *a*, OJIP, a diferentes tiempos del cultivo secuencial de *S.incrassatulus.* A. Fluorescencia variable relativa a cualquier tiempo, B. Δ de la fluorescencia variable relativa a cualquier tiempo.

De acuerdo con lo observado en las gráficas de fluorescencia (Figura 12), para la muestra T4 de heterotrofía (119 h), se presenta un bloqueo muy marcando en el flujo electrónico entre O

y J, aproximadamente a los 0.1 ms, este punto se ha asociado con la interacción entre el complejo liberador de O_2 (CLO) y el PSII, el flujo en esta etapa parece restituirse por completo con la exposición del cultivo a la luz ya que desde las primeras 6h de inducción (T1Luz), se reduce la concavidad de esta inflexión. Por otra parte, el transporte entre QA y QB (J-I), también presenta un bloqueo, el cual no se corrige totalmente con la exposición del cultivo a la luz, ni siquiera después de 48 h de iluminación (T4Luz). Entre I y P se puede apreciar un estímulo en flujo de electrones el cual permanece cuando el cultivo es iluminado, aunque en menor proporción.

Guenther et al. (1990), reportan un fenómeno denominado "conversión del $PSII_\beta$, Q_B-no reducido a la forma $PSII_\alpha$, Q_B-reducido" que es la forma madura del PSII. Durante el cultivo heterotrófico de *Chlamydomonas reinhardtii*, esta microalga es capaz de sintetizar clorofilas y los componentes de los fotosistemas, sin embargo el análisis de cada uno de los componentes del sistema fotosintético, reveló que $PSII_\beta$ era la forma predomínate del PSII, esta se caracteriza porque las clorofilas de la antena periférica (LCH-II periférica) se encuentran desacopladas de los centros de reacción, por otra parte hay una proporción de centros de reacción de los fotosistemas que son fotoquímicamente competentes pero no pueden transferir electrones de Q_A a Q_B estos se conocen como centros de reacción Q_B-no reducido, esto ocurre porque no hay interacción entre Q_A y Q_B. Después de tan solo 30 min de iluminación del cultivo de *C. reinhardtii*, crecido en la oscuridad, una gran población del PSII cambia de la forma $PSII_\beta$ a la forma madura $PSII_\alpha$ y se restablece el flujo de electrones entre Q_A y Q_B. Aún se desconoce el mecanismo exacto de la activación del PSII por la luz, pero se cree que involucra la movilización de sus componentes dentro de la membrana tilacoide y un mecanismo de reparación en el que interviene la proteína D1 (Gunther et al., 1990).

El fenómeno reportado por Gunther et al. (1990), puede explicar lo observado a través de la medición de la fluorescencia de la clorofila *a*, tanto en la derivatización del flujo de energía, como en las cinéticas de fluorescencia. Hay una gran probabilidad de que el desacoplamiento de los componentes del PSII de *S. incrassatulus* se refleje en la disminución de la eficiencia

fotoquímica para el transporte electrónico y el aumento en la disipación térmica, a medida que la microalga crece en la obscuridad, el restablecimiento de la funcionalidad del PSII una vez que el cultivo es iluminado indica que todos los componentes del PSII están presentes en la microalga, pero en este caso la luz es el factor que estimula su correcto ensamblaje. Tal y como se observa en la gráfica de Δ (Figura 12), dentro de los sitios afectados negativamente en la cadena de transporte electrónico fotosintético están la interacción entre el CLO y el PSII, así como Q_A y Q_B. En el primer caso el taponamiento de flujo de electrones a nivel del CLO, manifiesta la perdida de actividad del CLO, de acuerdo con lo reportado por diferentes autores este fenómeno se debe a un incremento en el ΔpH a través de la membrana tilacoidal, lo que conduce a la liberación del Mn^{+4} del centro nucleofílico del CLO. Cultivos de *Chlorella* sometidos a largos periodos de obscuridad presentan una pérdida de la actividad del CLO, con una completa recuperación de esta cuando el cultivo es iluminado (Chemeris et al., 2004). Tal como se reportó para *Chlorella* el restablecimiento de la actividad del CLO de *S. incrassatulus* se lleva a cabo en menos de 6 h de iluminación y esto es evidente por la completa desaparición del bloqueo a nivel de K en la cinética de la fluorescencia relativa (Figura 12 B).

La desactivación del CLO también se ha relacionado con la acumulación de una forma disfuncional del PSII, incapaz de llevar a cabo la trasferencia de electrones de Q_A a Q_B, tal como se reporta para *C. reinhardtii*, y de acuerdo con lo que se observa en este trabajo con *S. incrassatulus*. Este fenómeno parece ser un mecanismo reversible de fosforilación de las proteínas D1 y/o D2 del PSII, dependiente del estado redox, por lo que su completa restitución es un proceso gradual y no depende solo de la magnitud de la exposición a la obscuridad (Chemeris et al., 2004).

CULTIVO HETEROTRÓFICO EN LOTE ALIMENTADO

Los datos experimentales obtenidos en lote fueron ajustados al modelo de Monod mediante simulación (Fig. 13), utilizando la plataforma Model Maker y se obtuvieron los valores para μmax y $Y_{x/s}$, 1.4424 ± 0.0168 d^{-1} y 0.5309 ± 0.092 g g^{-1} respectivamente con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.98$.

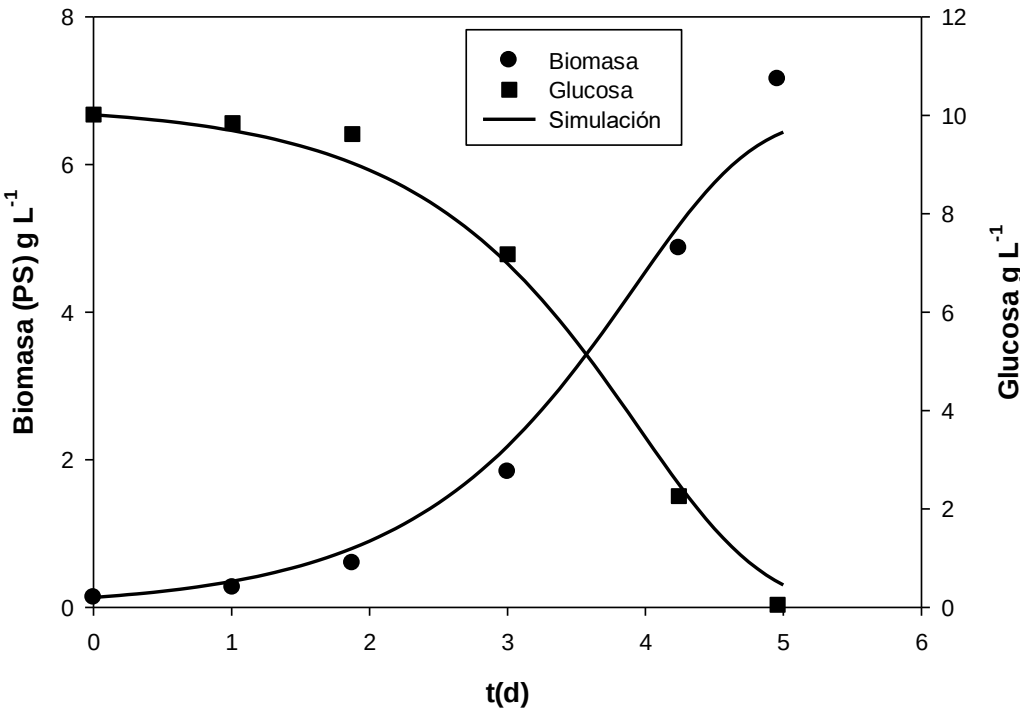


Figura 13. Ajuste de los datos experimentales de la cinética heterotrófica al modelo de Monod, mediante simulación. Concentración inicial de glucosa 12.185 g L^{-1}.

Estos parámetros cinéticos fueron empleados para establecer mediante simulación, un cultivo por lote alimentado como estrategia para incrementar la concentración de biomasa y la productividad de xantofilas. En la figura 14, se presenta la gráfica de crecimiento en lote alimentado obtenida mediante simulación.

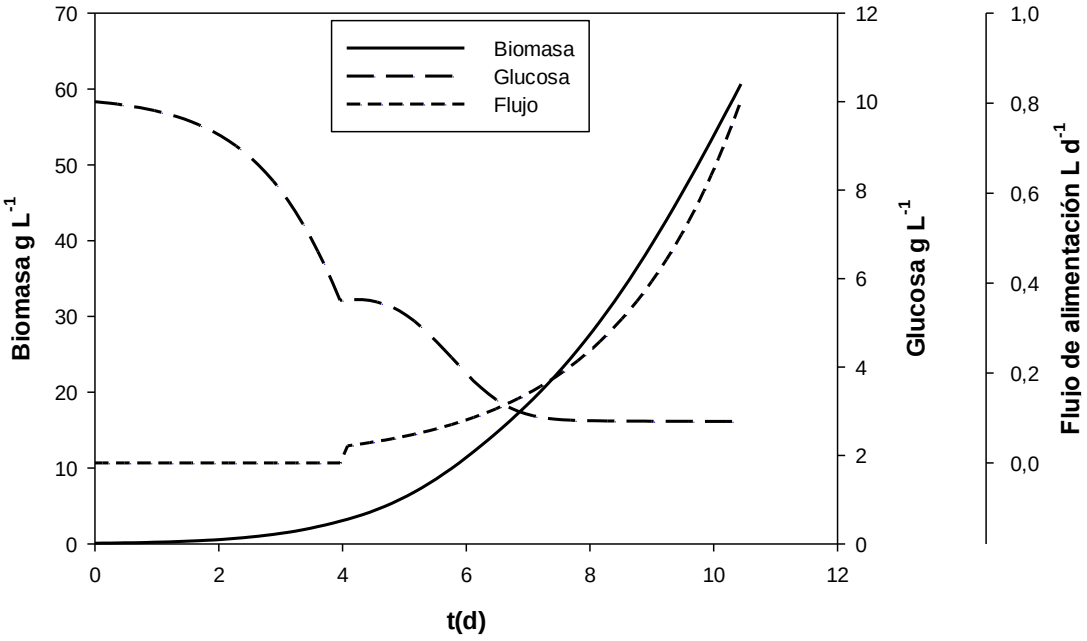


Figura 14. Simulación del crecimiento y consumo de sustratos de *S. incrassatulus* en lote alimentado

Los resultados obtenidos mediante simulación fueron evaluados experimentalmente, la solución de alimentación fue medio completo con 250 g L^{-1} de glucosa y 28.11 g L^{-1} de urea. El cultivo en lote alimentado de *S. incrassatulus*, permitió alcanzar una concentración máxima de biomasa de 35.675 ± 0.275 g L^{-1}, con una productividad de 3.225 ± 0.455 g L^{-1} d^{-1}; la velocidad crecimiento (μ) durante la fase de crecimiento exponencial fue de 0.623 ± 0.008 d^{-1}. La concetración de biomasa alcanzada en el cultivo en lote alimentado supera 5.2 veces la biomasa producida en lote, así mismo la productividad fue 2.6 veces mayor. De acuerdo a la simulación realizada, se esperaba alcanzar una concentración de biomasa de 60 g L^{-1} aproximadamente a los diez dias de cultivo, sin embargo, esto no se cumplió en ninguna de las cinéticas realizadas (Figura 15).

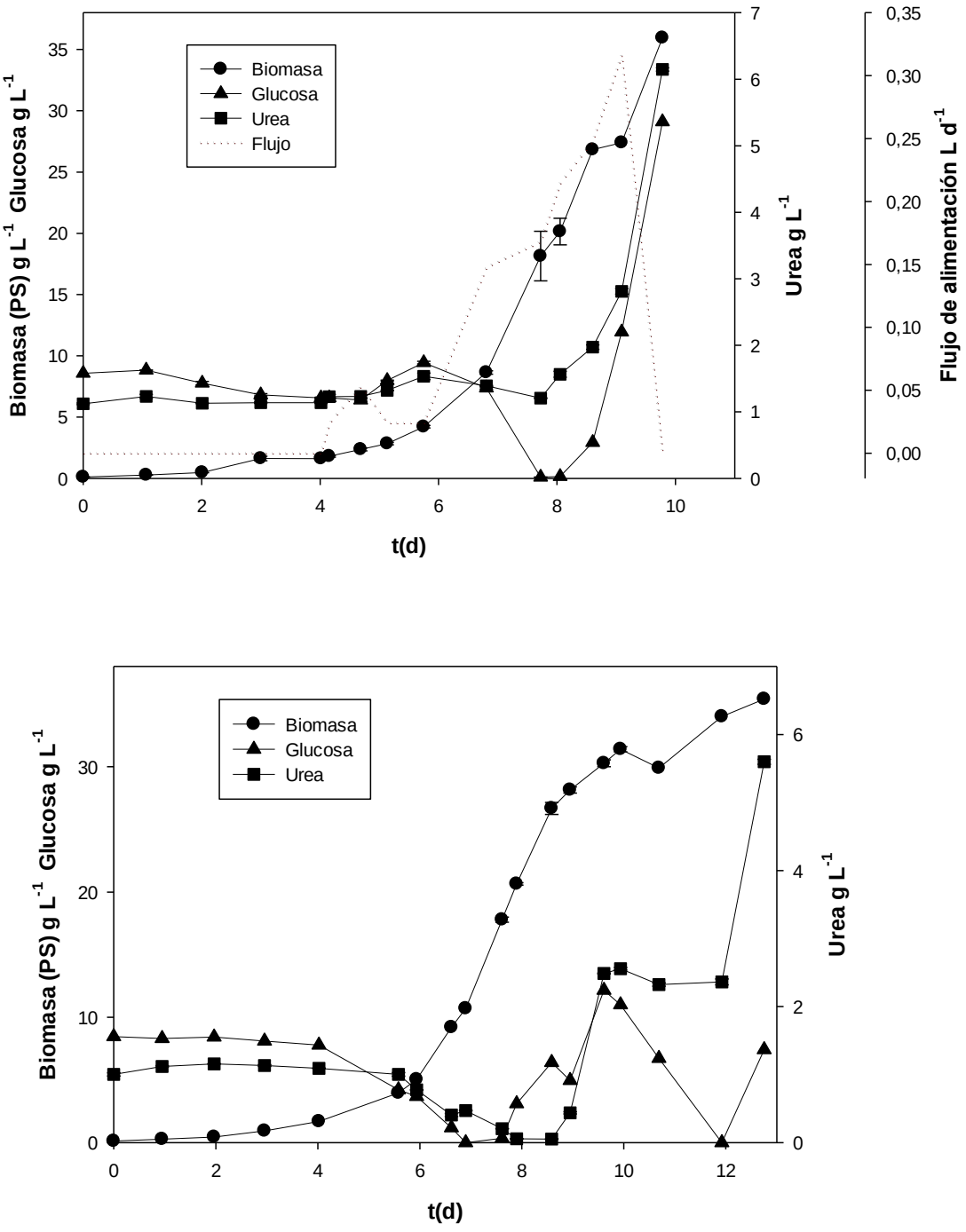


Figura15. Cinética de crecimiento y consumo de nutrientes de *S. incrassatulus* en lote alimentado. Concentración inicial de glucosa en el lote 12.185 g L^{-1}.

Durante la primera cinética aproximadamente a los 8 días de cultivo, se produjo un desvalance en la concentración de glucosa y urea en el medio de cultivo, la glucosa se agotó completamente deteniendo el crecimiento de la microalga y ocasionando acumulación de urea. Posteriormente, debido al régimen de alimentación, el nivel de glucosa se restituye rápidamente alcanzando 29 g L^{-1} a los 10 días de cultivo; en este mismo punto la concentración de urea fue de 6.1 g L^{-1}, lo que representa una relación C:N de 40, un valor muy elevado teniendo en cuenta que el rango más recomendable para este parámetro es de 6.2-8.2 (Baird and Middleton, 2004), por lo que se detuvo el cultivo. Uno de los factores que pudo influir sobre este comportameinto fue el inicio prematuro de la alimentación, el cual se realizó de acuerdo a lo establecido en la simulación, sin embargo este dato no fue muy preciso y el valor de la biomasa era tan solo de 1.8 g L^{-1} sin que la demanda de glucosa y urea fuera elevada. Con base en lo anterior se hicieron necesarias la evaluación inmediata del crecimiento y del consumo de glucosa, como indicadores de la dinámica del proceso. El crecimiento se siguió mediante la determinación de absorvancia a 680 nm y 750 nm, esta última sirvió como estimador del peso seco mediante las respectivas curvas de correlación (PS <1.8= (abs_{680} – 0.214)/0.958 y PS>1.8= (abs750 – 1.198)/0.654). El seguimiento de estas dos variables permitió determinar con mayor precisión el momento de inicio de alimentación durante la segunda cinética, aproximadamente a los 6 días de cultivo, con una concentración de biomasa y glucosa de 3.9 g L^{-1} y 4.22 g L^{-1} respectivamente.

Para evitar la acumulación de urea, durante la segunda cinética el medio de alimentación se preparó con una concentración de urea menor (5 g L^{-1}) sin embargo tanto la glucosa como la urea alimentadas fueron insuficientes por lo que se requirió modificar el flujo de alimentación en tres ocaciones sin que se lograra mantener la concentración de glucosa en el medio. Finalmente se dio un pulso de 10 ml de medio de alimentación y se modificó el flujo esto permitió aumentar el nivel de glucosa en el medio, por el contrario la urea fue consumida totalmente. A los 9 días de cultivo, se cambió el régimen de alimentacióna un flujo lineal y se inyectó un pulso de urea (3.51 g) con el objetivo de favorecer la relación C:N en el medio. En el momento en que la glucosa empezó a disminuir se restableció la alimentación exponencial con un flujo de 0.17 L d^{-1} este valor fue calculado con base en la concentración de biomasa y el rendimiento $Y_{x/s}$, así mismo teniendo en cuenta la relación estequiometrica

de C:N en la biomasa (7.81), se ajustó el contenido de urea en el medio de alimentación a 68.64 g L^{-1} (los demas componetes permanecieron constantes. El nuevo medio de alimentación y el flujo proporcionado evitaron la acumulación excesiva de glucosa, pero no se logró recuperar el crecimiento exponencial de la microalga, por lo que se detubo la alimentación y se dejo el cultivo en lote durante 2 dias. Se examinó un régimen de alimentación lineal (0.15 L d^{-1}) para evaluar la respuesta del cultivo, esto condujo a la acumulación de urea, por lo que el cultivo se detuvo.

Con base en los resultados observados, en las dos cinéticas (Figura 15), se presentaron eventos de acumulación y limitación de sustratos (glucosa y urea) que condujeron a la disminución en la velocidad de crecimiento. Debido a que en heterotrofía la glucosa es la fuente tanto de carbono como de energía, es considerada el susbtrato limitante, y es requerida tanto para el crecimiento como para el mantenimiento del metabolismo basal, la adición de sustrato se calculó de acuerdo con el rendimiento estimado a partir de las cinéticas en lote, utilizando los datos de la fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de crecimiento fue relativamente alta y la constante de mantenimiento fue mínima. A medida que el tiempo de cultivo se incrementa, aumentan los requerimientos energéticos para el mantenimiento. Tanto para las microalgas como para los organismos heterotróficos, se ha observado que la disminución en la tasa de crecimiento en condiciones limitadas de energía, esta relacionada con una disminución en el rendimiento $Y_{x/s}$ (Gons and Mur, 1980), esto se pudo comprobar con los resultados del cultivo en lote alimentado. Para determinar el requerimeinto de glucosa para matenimiento se evaluó su consumo durante una fase donde no hubo incremento en la biomasa y se obtuvo un valor 0.24 g glucosa g $biomasa^{-1}$, empleando la ecuación 6. Se calculó el rendimiento del substrato.

$$1/Y = 1/Y_{max} + m_q/\mu$$

Ecuación 6.

Donde Y es el rendimiento real, Y_{max} es el rendimiento observado (biomasa producida/susbtrato consumido) y m_q /μ es el mantenimiento.

$1/Y = 1/0.5544 + 0.24$

$Y = 0.489$

De acuerdo a esto el rendimiento fue más bajo que el utilizado para los cálculos del flujo de alimentación (0.5309) y por esta razón el crecimiento se vio limitado y favoreció la acumulación de urea en el medio de cultivo lo que inhibió completamente el crecimiento.

La inhibición del crecimiento puede estar dada por la formación de amonio, a partir de la urea. De acuerdo con lo reportado por Hodson et al. (1975) las microalgas clorofíceas como *Chlamydomonas* y *Chlorella*, metabolizan la urea mediante la acción de la urea amidoliasa, el cual es un sistema enzimático que comprende dos actividades enzimáticas diferentes, la primera es la urea carboxilasa que se encarga de convertir la urea en alofanato, posteriormente la alofanato liasa hidrolisa el alofanato para producir amonio y bicarbonato, al parecer el catabolismo de la urea está regulado en las microalgas por un sistema de represión-inducción; cuando la urea está presente en el medio induce la síntesis de las enzimas necesarias para su consumo, sin embargo en presencia de amonio la concentración intracelular de la urea carboxilasa disminuye notablemente, lo que detiene el metabolismo de la urea. Por otra parte algunos autores reportan que puede haber inhibición del crecimiento microalgal a concentraciones de urea relativamente altas, la concentración no se puede establecer con precisión ya que depende de la cepa con la que se trabaje y de las condiciones de crecimiento, por ejemplo, Choochote et al. (2010)) reporta la inhibición en el crecimiento de *Chlorella* sp. a concentraciones de urea superiores a 1 g L^{-1}, Shi et al. (2002) encontraron que arriba de 3.9 g L^{-1} de urea en el medio de cultivo inhibían el crecimiento de *Chlorella protothecoides*, no existen reportes para organismos del género *Scenedesmus* sp. pero es evidente que aún entre especies del mismo género la susceptibilidad a la urea puede variar.

Durante las cinéticas en lote no se había presentado este fenómeno, porque la concentración inicial de urea se encuentra en un rango aceptable para la microalga (1.3 g L^{-1}), en el lote alimentado por otra parte se pueden presentar los dos fenómenos, el bloqueo del metabolismo de la urea por la generación de amonio y/o la inhibición del crecimiento por la acumulación de urea.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y UREA PARA EL CRECIMIENTO HETEROTROFICO DE *Scenedesmus incrassatulus*

Debido a que existe poca información sobre la relación entre la acumulación de glucosa y urea con la inhibición del crecimiento, se planteó un experimento en matraces para evaluar el efecto de la concentración de estos sustratos sobre el crecimiento de *S. incrassatulus* y buscar condiciones optimas para el cultivo heterotrófico de la microalga. Se utilizó un diseño compuesto central, con una base factorial 2^2, adicionada con puntos centrales y axiales. En la tabla 11, se presentan la matriz del diseño con los valores reales de urea y glucosa (variables), junto con la máxima concentración de biomasa y la productividad obtenida para cada combinación.

Bajo las condiciones evaluadas, se presentó un amplio rango de variación para la concentración de biomasa, siendo 3.65 g L^{-1} y 30.45 g L^{-1} el mínimo y el máximo valor correspondientes. En el caso de la productividad el rango de variación fue más estrecho y osciló entre 0.42 g L^{-1} d^{-1} y 3.34 g L^{-1} d^{-1}. Con base en la desviación estándar de los puntos centrales (9-13), el error experimental fue de 1.39 g L^{-1} para la concentración de biomasa y de 0.18 g L^{-1} d^{-1} para la productividad.

Tabla 11.Concentración de biomasa y productividad de *S. incrassatulus* en el diseño experimental.

UNIDAD EXPERIMENTAL	Codigo del diseño	Valores reales de las variables ($g\ L^{-1}$)		Máxima biomasa ($g\ L^{-1}$)	Productividad ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$)
		Glucosa	Urea		
1	-1-1	10	0.7	7.68	1.233
2	-1 1	10	3.3	8.85	0.719
3	1-1	40	0.7	15.77	1.936
4	1 1	40	3.3	27.00	3.345
5	-α 0	3.79	2	3.65	0.424
6	0 -α	2	0.16	4.18	0.486
7	α 0	46.21	2	30.45	2.513
8	0 α	25	3.84	17.29	2.133
9-13	0 0	25	2	21.11	2.599
				20.65	2.546
				19.07	2.346
				20.98	2.594
				19.41	2.396

Los datos obtenidos fueron analizados con el software estadístico Design Expert 7.1.6. y la correlación entre las respuestas (Concentración de biomasa y productividad) y las variables (glucosa (Glu) y urea (Ur)), fue determinada de acuerdo con sus respectivos modelos de orden cuadrático, como se indica a continuación:

$$\text{Biomasa PS } (gL^{-1}) = -6.63 + 0.55*Glu + 10.10*Ur + 0.13*Glu*Ur - 0.0054*Glu^{2} - 2.60*Ur^{2}$$

Ecuación 7.

$$\text{Productividad } (gL^{-1}d^{-1}) = -0.49 + 0.094*Glu + 0.85*Ur + 0.025*Glu*Ur - 0.002*Glu^{2} - 0.29*Ur^{2}$$

Ecuación 8.

La exactitud y la capacidad de predicción de los modelos se evaluó mediante el análisis de varianza (ANOVA) presentado en la tabla 12. Tanto para la concentración de biomasa como para la productividad, el coeficiente de correlación (R^2) de los modelos obtenidos es alto y de acuerdo con los respectivos "P-Value", los modelos son significativos con un nivel de confianza mayor al 99%, lo que indica que puede ser utilizado para explorar la superficie de respuesta. El análisis estadístico, indica la relevancia de las variables y sus interacciones, sobre el crecimiento de *S. incrassatulus* mediante el valor de la probabilidad de error "P-Value", los términos con $p<0.05\%$ son considerados como los de mayor influencia sobre la producción de biomasa y la productividad.

Tabla 12. ANOVA para los modelos cuadráticos obtenidos con el diseño experimental.

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**		**Grados de libertad**		**Cuadrados medios**		**F- Value**		**p-Value Prob>F**	
	Biomasa	**Productividad**	**Biomasa**	**Productividad**	**Biomasa**	**Productividad**	**Biomasa**	**Productividad**	**Biomasa**	**Productividad**
Modelo	795.12	9.66	5	5	159.02	1.93	35.60	19.85	<0.0001	0.0005
A-Glucosa	514.19	4.93	1	1		4.93	115.12	50.68	<0.0001	0.0002
B-Urea	119.73	1.3	1	1	119.73	1.3	26.80	13.35	0.0013	0.0082
AB	25.31	0.92	1	1	25.31	0.92	5.66	9.50	0.048	0.0178
A^2	10.22	1.16	1	1	10.22	1.16	2.28	11.96	0.174	0.0106
B^2	132.95	1.66	1	1	132.95	1.66	29.76	17.05	0.001	0.0044
Residual	31.27	0.68	7	7	4.47	0.097	---	---	---	---
Falta de ajuste	23.47	0.63	3	3	7.82	0.21	4.01	15.14	0.1064	0.012
Error puro	7.80	0.055	4	4	1.95	0.014	---	---	---	---
Total	826.38	10.34	12	12	---	---	---	---	---	---

R^2= 0.96 0.93 Raj^2= 0.93 0.89

De acuerdo con la tabla 12 y con los coeficientes estimados para cada uno de los términos del modelo (tabla 13), la concentración de glucosa es el factor de mayor influencia sobre la producción de biomasa. La concentración de biomasa incrementa conforme aumenta la concentración de glucosa y urea en el medio de cultivo, descartando algún efecto de interacción entre las variables, sin embargo, de acuerdo con los valores asignados a los términos cuadráticos de la glucosa y la urea, a concentraciones elevadas de estos sustratos se puede presentar inhibición del crecimiento principalmente en el caso de la urea. La productividad se puede ver mayormente afectada por las concentraciones altas de sustratos, ya que los términos cuadráticos del modelo correspondiente tienen coeficientes con valores muy similares a los términos lineales, pero negativos.

Tabla 13. Coeficientes estimados para cada uno de los términos de los modelos cuadráticos.

Factor	**Coeficiente estimado**	
	Biomasa	**Productividad**
Intercepto	19.94	2.49
A-Glucosa	8.01	0.78
B-Urea	3.86	0.40
AB	2.51	0.48
A^2	-1.21	-0.40
B^2	-4.37	-0.48

Las gráficas de superficie y contornos fueron obtenidas a partir de los respectivos modelos (ecuaciones 7 y 8) y se presentan en la figura 16, en ellas se puede apreciar gráficamente el comportamiento predicho.

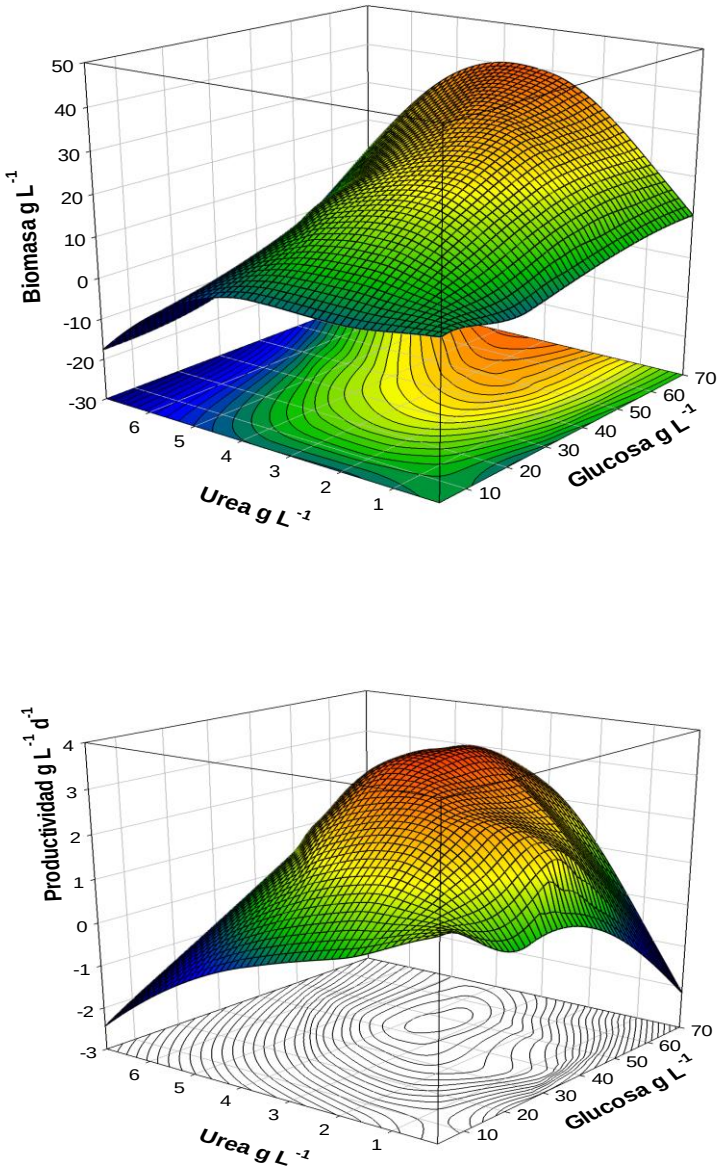


Figura 16. Efecto de la concentración de glucosa y urea sobre la producción de biomas a y la productividad de *S. incrassatulus.*

De acuerdo con lo observado la concentración de biomasa incrementa conforme aumentan la concentración de glucosa y urea en el medio de cultivo, alcanzando máximos de productividad en un rango de concentración entre 30 - 50 g L^{-1} de glucosa y 2.8 - 4 g L^{-1} de urea, a concentraciones superiores, la productividad disminuye drásticamente. Esto apoya las

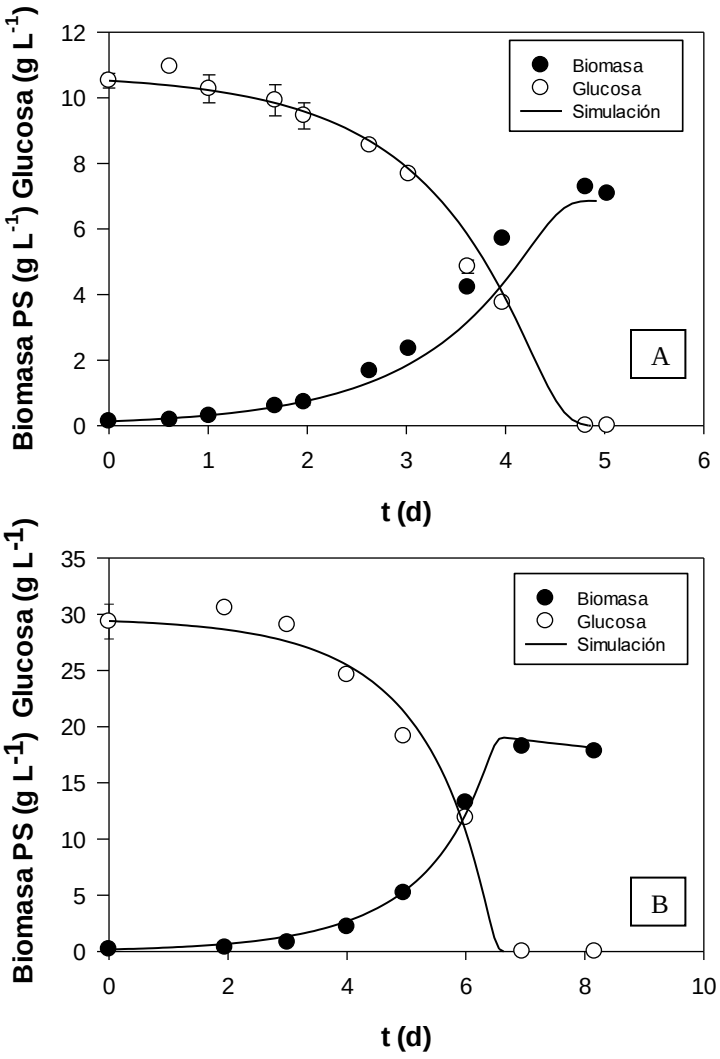
observaciones hechas durante el cultivo por lote alimentado, donde la acumulación de urea a concentraciones cercanas a 6 g L^{-1} provocaron un cese del crecimiento de *Scenedesmus incrassatulus.* Las concentraciones óptimas fueron establecidas mediante la herramienta de optimización del sofware Design Expert 7.1.6 y corresponden a 32.53 g L^{-1} de glucosa y 2.86 g L^{-1} de urea para alcanzar una productividad de 3 g $L^{-1}d^{-1}$. Los resultados de la optimización fueron evaluados experimentalmente mediante cinéticas en lote. En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento en lote en reactor con concentraciones optimizadas de urea y glucosa.

Tabla 14. Resultados obtenidos en las cinéticas heterotróficas en lote con concentraciones optimizadas de glucosa y urea.

Parámetro	
Máxima biomasa producida (g L^{-1})	17.985 ± 0.225
Productividad (g L^{-1} d^{-1})	2.508 ± 0.332
Tiempo de cultivo (d)	6.56 ± 0.39
μ media (d^{-1})	0.745 ± 0.015
$Y_{x/s}$ (gPS $gGlu^{-1}$)	0.592 ± 0.022

De acuerdo con los resultados experimentales, los modelos obtenidos son aceptables y sirven para predecir el comportamiento de la microalga durante su crecimiento heterotrófico, las diferencias observadas están dentro del rango de error permitido y pueden ser atribuidas a las diferencias propias entre el cultivo en matraz y reactor, ya que en matraz, el control de las variables (pH y Ox.D) es muy limitado, pero el estrés hidrodinámico es menor y esto influye tanto en el crecimiento como en la productividad de *Scenedesmus incrassatulus*, como ya se mencionó antes y también se ha reportado para otras microalgas (García Camacho et al., 2000; Hodaifa et al., 2010; Leupold et al., 2013; Shi et al., 1999).

Por otra parte, la productividad obtenida en concentraciones optimizadas de urea y glucosa mejoró 1.7 veces con respecto al cultivo en lote en reactor en condiciones no optimizadas (1.48 g L^{-1} d^{-1}) aunque la μ y el rendimiento ($Y_{x/s}$) disminuyeron 18.4% y 14.45% respectivamente, esto comprueba el comportamiento predicho por el modelo estadístico en lo referente al efecto inhibitorio de la concentración inicial de glucosa sobre el crecimiento de *Scenedesmus incrassatulus*. Es necesario aclarar que en las concentraciones de glucosa empleadas no se observa un efecto severo sobre el crecimiento por lo que la productividad se ve favorecida, resultados similares fueron reportados para *C. protothecoides* (Shi et al. 1999). De acuerdo con la predicción del modelo estadístico, solo concentraciones iniciales de glucosa superiores a 50 g L^{-1} tendrían un efecto drástico sobre el crecimiento de *S. incrassatulus*. Para poder determinar con presión los parámetros de crecimiento bajo inhibición, los datos experimentales obtenidos en las cinéticas de lote con baja y alta concentración de glucosa (12.195 g L^{-1} y 32.53 g L^{-1}) fueron ajustados al modelo de Andrews, mediante simulación (Fig. 17) los resultados obtenidos fueron los siguientes: μ_{max} 1.189 d^{-1}; K_s 1.1525 g L^{-1}; $Y_{x/s}$ 0.67 y K_i 39.143 g L^{-1}. Adicionalmente empleando las ecuaciones descritas por Shi (1999) se obtuvo la concentración óptima de sustrato bajo inhibición (S_{mi}) y la velocidad máxima de crecimiento bajo inhibición (μ_{maxi}) para *S. incrassatulus*, con valores de 6.7166 g L^{-1} y 0.8852 d^{-1}, respectivamente.



.

Figura 17. Crecimiento y consumo de nutrientes de *S. incrassatulus* en lote heterotrófico con 10. 6 g L^{-1} de glucosa (A) y 30.3 g L^{-1} de glucosa (B). Las barras de error representan la media ± el error estándar de dos réplicas biológicas independientes.

La presencia de inhibición por glucosa, explica en cierta medida las diferencias observadas en los cultivos de *S. incrassatulus* en matraz y en reactor. En matraz la μ observada fue 1.025 ± 0.002 d^{-1}, con una concentración inicial de glucosa de 8.56 g L^{-1}, estos valores se acercan a los valores óptimos calculados (μ_{max} 1.189 d^{-1} y S_{mi} 6.7166). Posteriormente, la velocidad de crecimiento disminuye conforme la concentración de glucosa inicial aumenta, tal como se registró para los dos lotes en reactor. Por otra parte, al comparar los parámetros cinéticos de *S. incrassatulus*, obtenidos en este trabajo, con los reportados para *C. protothecoides* (Shi et al.

1999), se puede observar que, aunque *C. protothecoides* puede alcanzar una mayor μ (2.4547 d^{-1}) esta disminuye más del 50% en condiciones de inhibición por glucosa. Además, las contantes de afinidad y de inhibición por sustrato, toman valores muy cercanos entre sí, si se comparan con las obtenidas para *S. incrassatulus.* Esto indica que *S. incrassatulus* y *C. protothecoides* poseen diferentes estrategias metabólicas para su crecimiento heterotrófico y que *S. incrassatulus* presenta una mayor tolerancia a la glucosa como única fuente de carbono.

Son escasos los estudios en los que se ha investigado sistemáticamente el efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento de las microalgas, algunos reportes ofrecen resultados muy variables, con especies que presentan efectos inhibitorios a concentraciones >1 g L^{-1}, como es el caso de *S. acutus* y otras que toleran sin dificultad hasta 200 g L^{-1} como *Galdieria sulphuraria* y *Schizochytrium* sp. (Bumbak, 2011). Esto hace necesario determinar la tolerancia a la glucosa de la especie en particular que se deseé cultivar, de esta manera se pueden adecuar las condiciones de cultivo y el modo de operación para obtener la mayor productividad de biomasa y/o productos de interés. Es necesario resaltar que desde el punto de vista comercial la productividad resulta más relevante en la elección de la concentración inicial de glucosa que la velocidad de crecimiento.

Para evaluar la efectividad de la fase de fotoinducción a una alta densidad celular (~18 g L^{-1}), se realizó un cultivo en dos etapas: lote heterotrófico/fotoinducción y se observó su efecto sobre la producción de luteína. Una vez consumida la glucosa en la fase heterotrofica, el cultivo fue transferido a un fotobiorreactor multitubular airlift para la fotoinducción. Después de 48-h de iluminación la concentración celular disminuyó ~20% con respecto al final de la heterotrofía, esto debido posiblemente a que el requerimiento de carbono y energía para el mantenimiento celular no fue suplido en las condiciones ensayadas, considerando la alta densidad celular alcanzada en heterotrofía, esto generó un desequilibrio energético que se tradujo en pérdida de biomasa, este comportamiento también fue reportado por Fan et al. (2012) para *Chlorella*.

Como se puede observar en la figura 18, el contenido de clorofilas y carotenoides incrementó rápidamente después de la transferencia del cultivo a la luz de manera similar a lo observado en el cultivo secuencial con menor densidad celular (Fig. 8). De esta manera, el contenido de

clorofila total pasó de 23.49 ± 0.714 mg g^{-1} PS a 36.542 ± 0.453 mg g^{-1} PS y los carotenoides totales aumentaron 32.6 % pasando de 3.738 ± 0.091 mg g^{-1} PS a 4.946 ± 0.167 mg g^{-1} PS. Esto indica que la adición de un paso de fotoinducción posterior al crecimiento heterotrófico (TSHP), permite que la concentración de pigmentos en la biomasa se restituya y es aplicable a cultivos con altas densidades celulares.

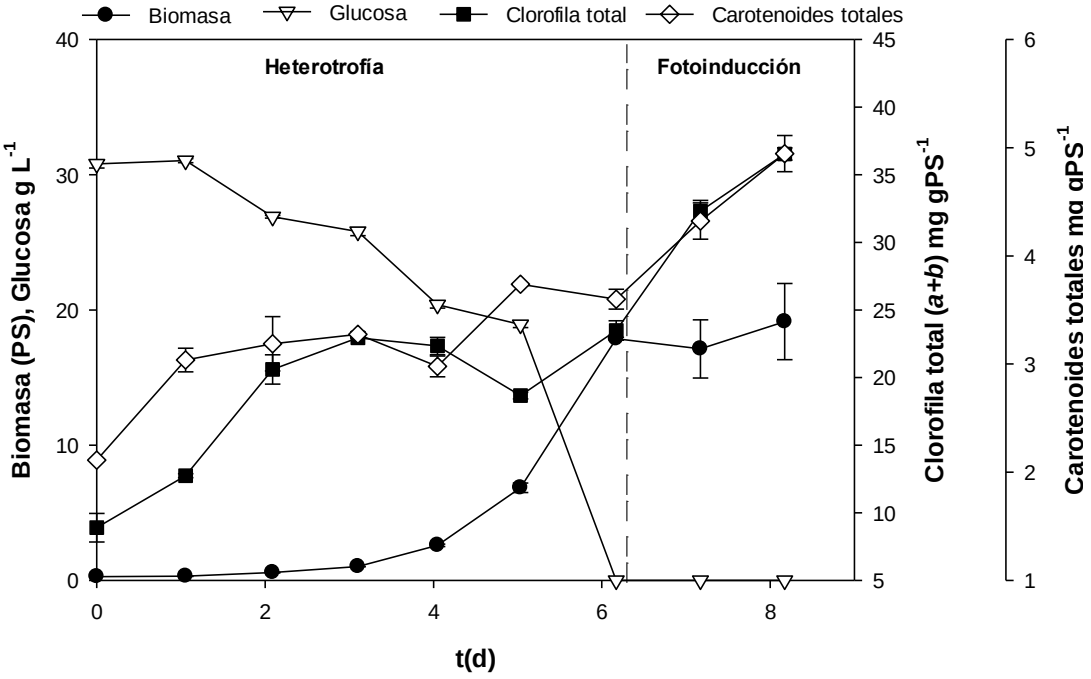


Figura 18. Crecimiento y composición celular de *S. incrassatulus* durante el TSHP en biorreactor de 6-L/ fotobioreactor multitubular 3-L con 32.53 g L^{-1} al inicio del cultivo heterotrófico. Las barras de error representan la media ± error estándar de dos replicas biológicas independientes.

De acuerdo con los resultados, el proceso TSHP influyó tanto en el contenido de pigmentos de *S. incrassatulus* como en su composición. Al final del crecimiento heterotrófico, la luteína constituyó 4.4 % del contenido total de carotenoides (0.163 ± 0.048 mg g^{-1} PS) y después de 48 h de fotoinducción esta proporción aumentó a 26.73 %, alcanzando un contenido específico de luteína de 1.322 ± 0.106 mg g^{-1} PS, e indicando la importancia de este pigmento en la adaptación de *S. incrassatulus*, al pasar de la oscuridad a la luz. Adicionalmente, la productividad de luteína

de *S. incrassatulus* en el proceso TSHP mejoró 1.63 veces en comparación al cultivo autotrófico en lote alimentado de esta microalga y alcanzó valores comparables a los reportados para otras microalgas cultivadas en autotrofía (Tab. 15). Aunque *S. incrassatulus* pueden sintetizar luteína en la oscuridad, su contenido es muy reducido en comparación con los niveles reportados en autotrofía (8.13 mg g^{-1} PS). Mediante la adición de una fase de fotoinducción se logró recuperar parcialmente el contenido de luteína (16%) de *S. incrassatulus* y es posible que optimizando las condiciones de fotoinducción el nivel de luteína en las células pueda recuperarse en su totalidad. De acuerdo con García-Cañedo et al. (2016), en autotrofía, la luteína puede llegar a ocupar un 68% de los carotenoides totales de *S. incrassatulus*, con base en estos datos se puede estimar que es posible alcanzar un contenido de luteína de 3.36 mg g^{-1} PS y una productividad de 8.43 mg Lut $L^{-}1$ d^{-1}, lo que podría ser comparable a lo reportado usando *Chlorella protothecoides* en cultivo heterotrófico por lote, de 7.75 – 11.29 mg Lut L^{-1} d^{-1} (Shi et al., 2000). Lo anterior demuestra el potencial del cultivo en dos etapas heterotrofía-fotoinducción (TSHP), para la producción de biomasa y luteína por *S. incrassatulus*.

Tabla 15 Comparación del contenido específico y la productividad de luteína de *S. incrassatulus* con los obtenidos en otros trabajos relacionados.

Tipo de cultivo /modo de operación	**Microalga**	**Contenido de luteína (mg g^{-1} DW)**	**Productividad de luteína (mg L^{-1} d^{-1})**	**Referencia.**
Autotrofía/ Batch	*Chlorella minutissima*	6.05	3.45	Dineshkumar et al., 2015
Autotrofía/ Batch	*C. zofingiensis*	3-6	2.5-4	Del Campo et al., 2004
Autotrofía/ Batch	*C. fusca* SAC 211	4.7	1.55	Del Campo et al., 2000
Autotrofía/ Batch	*Muriella decolor* SAG 249	0.5	0.9	Del Campo et al., 2000
Autotrofía/ Batch	*Muriellopsis* sp.	5.55	5.4	Del Campo et al., 2000
Autotrofía/ Batch	*Scenedesmus obliquus* FSP-3	4.84	1.45	Ho et al., 2014
Autotrofía/ Batch	*S. obliquus* ESP-5	1.86	0.84	Ho et al., 2014
Autotrofía/ Batch	*S. obliquus* AS-6	2.75	0.94	Ho et al., 2014
Autotrofía/ Batch	*Scenedesmus* sp.	2.5	0.51	Yen et al., 2011
Mixotrofía/ Batch	*Scenedesmus* sp	2	0.36	Yen et al., 2011
Autotrofía/ Continuo	*S. almeriensis*	5.5	4.9	Fernandez-Sevilla et al., 2010
Heterotrofía/ Batch	*Chlorella protothecoides*	1.75-1.98	4	Wei et al., 2008
Heterotrofía/ Batch	*C. protothecoides*	4.58	11.29	Shi et al., 2000
Autotrofía/ Feed Batch	*Scenedesmus incrassatulus*	8.13*	1.88	García-Cañedo et al., 2016
TSHP/Batch	*S. incrassatulus*	1.49±0.03	3.10±0.06	Este trabajo

*Calculado a partir de los datos presentados.

LOTE ALIMENTADO CON CONCENTRACIONES INICIALES DE GLUCOSA Y UREA OPTIMIZADAS

Empleando las condiciones optimizadas (concetración de glucosa y urea) en lote se realizó un cultivo por lote alimentado utilizando medio completo como solución de alimentación con 200 g L^{-1} de glucosa y 17.38 g L^{-1} de urea para mantener una relación C:N de 8.69. La fase de alimentación se inició a los 6 días de cultivo con un flujo de 0.1357 L d^{-1} y un régimen de alimentación exponencial con μ de 0.73 d^{-1}. Como se puede observar en la figura 19, la demanda permanente de sustratos por parte de *S. incrassatulus* no permitió que se presentara acumulación y el proceso se desarrollo de forma más controlada.

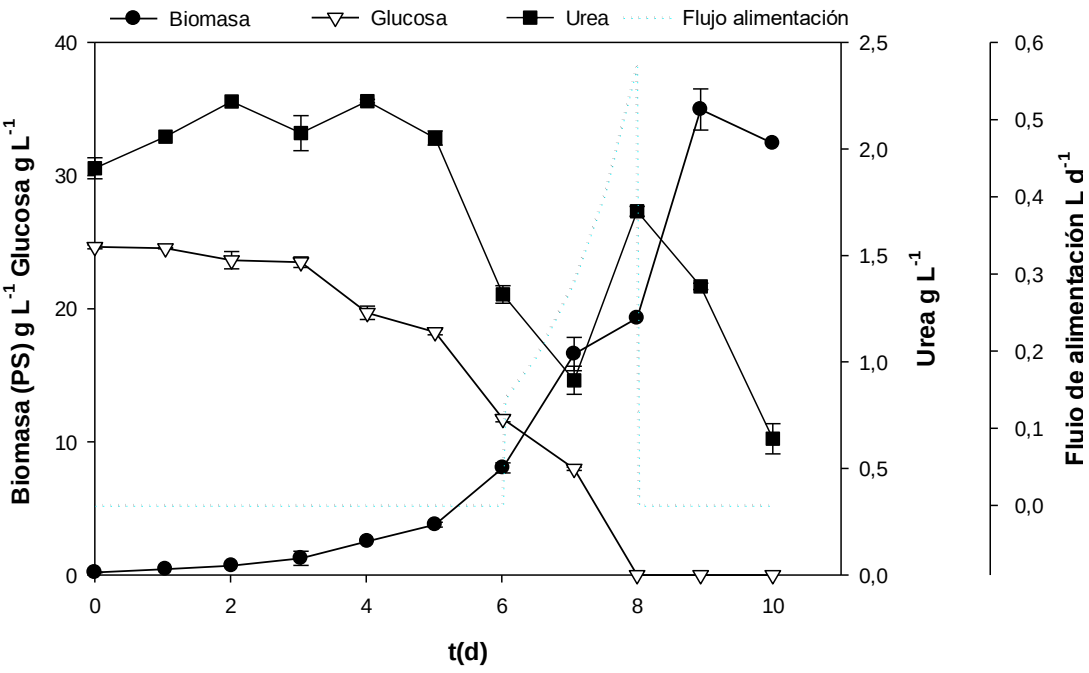


Figura 19. Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de *S. incrassatulus* durante el cultivo en lote alimentado, con concentraciones iniciales de glucosa y urea optimizadas.

Con el cultivo en lote alimentado la concentración de biomasa obtenida fue 90.9% mayor en comparación con el cultivo en lote y la productividad mejoró 62.1%, en la tabla 16 se puede apreciar un resumen de los resultados del cultivo en lote alimentado. Adicionalmente, al

comparar los resultados obtenidos en los dos experimentos en lote alimentado (antes y después de la optimización de las concentraciones de glucosa y urea), se puede observar que la máxima concentración de biomasa fue similar en los dos procesos, sin embargo, la productividad mejoró 26.08% después de la optimización, por otra parte, el proceso fue más controlado y reproducible.

Tabla 16. Resultados obtenidos en cultivo por lote alimentado de *S. incrassatulus*. Lote alimentado I: antes de la optimización de glucosa y urea. Lote alimentado II: después de la optimización. Se presentan la media ± error (n=2).

Parámetro	Lote alimentado I	Lote alimentado II
Máxima biomasa producida (g L^{-1})	35.675 ± 0.275	34.33 ± 0.74
Productividad (g L^{-1} d^{-1})	3.225 ± 0.455	4.066 ± 0.12
Tiempo de cultivo (d)	11.26 ± 1.49	8.416 ± 0.30
μ media (d^{-1})	0.623 ± 0.008	0.73 ± 0.012

La limitación para alcanzar una mayor concentración celular fue la demanda de oxígeno disuelto, ya que en las condiciones operadas (350 rpm y 1vvm aire) no se logró mantener el oxígeno disuelto arriba de 20% para una concentración de biomasa mayor a 35 g L^{-1} (Figura 20), esto considerando que el incremento en la velocidad de agitación y en el flujo de aire puede conducir a lisis celular, como se observó anteriormente en el cultivo.

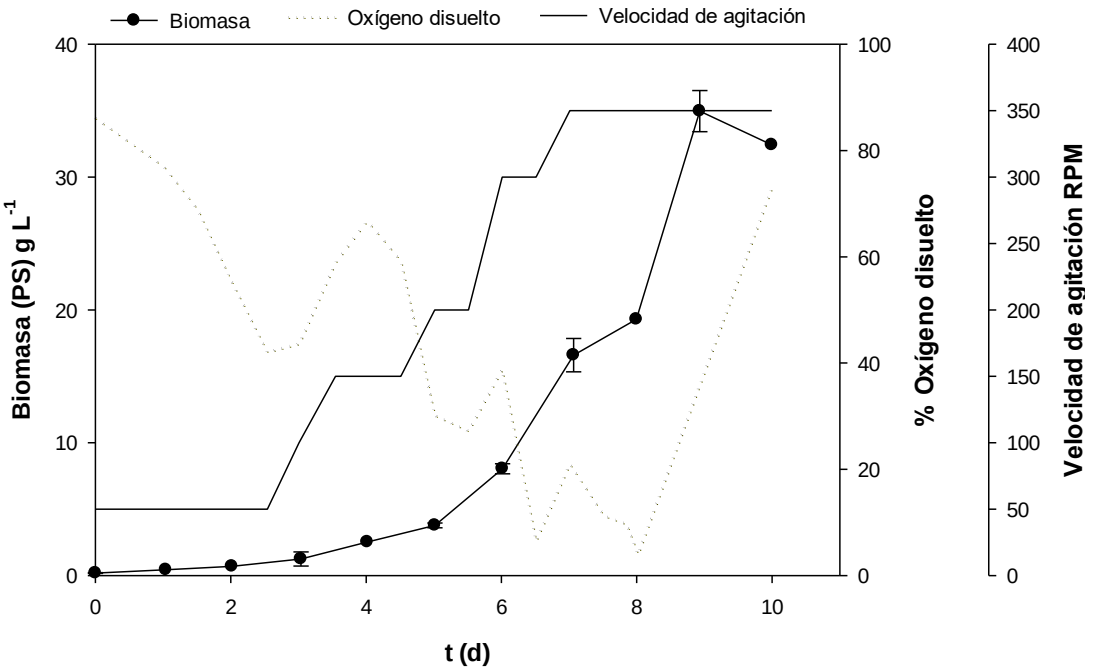


Figura 20. Perfil de oxígeno disuelto durante la cinética en lote alimentado de *S. incrassatulus.*

La demanda de oxígeno disuelto es un factor relevante para el cultivo heterotrófico de *S. incrassatulus,* de manera similar a lo reportado para otras microalgas cultivadas heterotróficamente. En estudios realizados principalmente con cepas de *Chlorella* se refiere que la demanda de oxígeno disuelto es uno de los factores limitantes para la obtención de altas densidades celulares, para soportar la demanda de oxígeno disuelto de un cultivo de *C. prothotecoides,* a una concentración de 45 g L^{-1} en un reactor de 30 L, fue necesaria una velocidad de agitación de 480 rpm (Shi et al., 2002), Doucha y Livansky (2011) reportan el uso de velocidades superiores a 700 rpm, para sostener la demanda de oxígeno disuelto de un cultivo de *C. vulgaris* con concentraciones superiores a 80 g L^{-1}, en un reactor de 50 L; Wu and Shi (2007) reportan el uso de una cascada de agitación y oxígeno, para lograr sostener el oxígeno disuelto de cultivos de *C. pyrenoidosa* con concentraciones superiores a 100 g L^{-1}. En todos los casos reportados la alternativa inicial es el incremento en la velocidad de agitación, sin embargo, esto o es recomendable para todos los organismos, en el caso de *S. incrasatulus,* se ha observado que a velocidades superiores a 350 rpm se incrementa la lisis celular. Sería necesario realizar un estudio enfocado en el efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad de crecimiento, la productividad y la lisis celular de *S. incrassatulus* a altas densidades celulares, para determinar

con precisión el límite de revoluciones que se puede aplicar al cultivo. Por otra parte, se pueden explorar alternativas para mejorar la transferencia de oxígeno al cultivo y evitar el daño celular.

CULTIVO SECUENCIAL HETEROTROFIA (LOTE ALIMENTADO)/FOTOINDUCCIÓN, TSHP-LOTE ALIMENTADO

Después de crecer la microalga en lote alimentado heterotrófico se transfirió el cultivo a un fotobiorrreactor para la fase de fotoinducción (TSHP-lote alimentado) y se evaluó el comportamiento de los pigmentos fotosintéticos, los cuales presentaron una cinética similar a la observada en el cultivo por lote (Figura 21). Después de la trasferencia del cultivo a la luz, la concentración de clorofilas y carotenoides aumento hasta 21.70 ± 1.91 mg g^{-1} PS y 4.66 ± 0.167 mg g^{-1} PS lo que representa un 96.55% y 104.75% más que al final del cultivo heterotrófico, e indica la efectividad de la fotoinducción aún a esta elevada densidad celular.

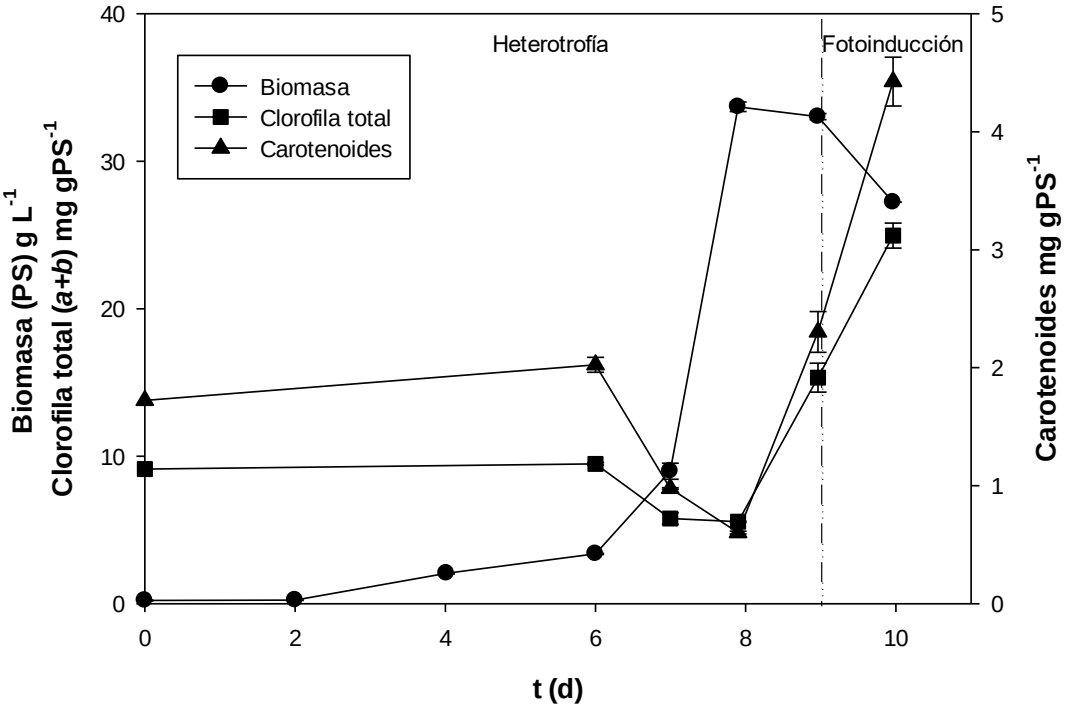


Figura 21. Producción de biomasa y pigmentos por *S. incrassatulus* durante el cultivo TSHP-lote alimentado.

El análisis del contenido de luteína en la biomasa de *S. incrassatulus* confirma lo observado por espectofotometría en relación con la efectividad de la fase de fotoinducción sobre la recuperación del contenido de pigmentos, después del crecimiento heterotrófico de la microalga. Como se puede observar en la tabla 17, a pesar de la disminución en el contenido de luteína durante el crecimiento heterotrófico, en el cultivo en lote alimentado la concentración especifica de luteína fue 2.245 veces mayor en comparación con el lote (0.163 mg g^{-1} PS), esto puede ser consecuencia del efecto de las vitaminas como promotores en la recuperación del contenido de pigmentos fotosintéticos en heterotrofía, tal como se planteó anteriormente en experimentos realizados en matraz, sin embargo sería necesario realizar un estudio bioquímico, para determinar los factores con mayor influencia sobre la acumulación de luteína en *S. incrassatulus,* bajo condiciones heterotróficas. La eficiencia de la fotoinducción se vio afectada por la densidad celular ya que el contenido específico de luteína en el cultivo con 34.334 g L^{-1} de biomasa fue 33.43% menor que en el cultivo con 17.985 g L^{-1}, como se puede apreciar en la tabla 17. Adicionalmente, el tratamiento de fotoinducción se detuvo a las 24 h ya que se presentó una pérdida considerable en la concentración de biomasa (13%), por lo que no hubo diferencia estadísticamente significativa, entre la concentración volumétrica de luteína alcanzada en el proceso TSHP-lote alimentado y la obtenida en el cultivo TSHP-lote. Los factores antes mencionados contribuyeron para que la productividad de luteína en el cultivo TSHP-lote alimentado fuera menor al proceso TSHP-lote.

Tabla 17. Contenido de luteína y su productividad durante el proceso TSHP con concentración inicial de sustratos optimizada.

	TSHP-Lote		**TSHP-Lote alimentado**	
Luteína	**Heterotrofía**	**Fotoinducción**	**Heterotrofía**	**Fotoinducción**
Biomasa (g L^{-1})	17.985 ± 0.225	19.141 ± 2.820	34.334 ± 0.743	29.830 ± 1.501
Contenido específico (mg g^{-1} PS)	0.163 ± 0.048	1.322 ± 0.106	0.366 ± 0.885	0.88 ± 0.169
Contenido volumétrico (mg L^{-1})	2.931 ± 0.037	25.304 ± 3.729	12.496 ± 3.038	26.194 ± 5.055
Productividad (mg L^{-1} d^{-1})	0.409 ± 0.054	3.074 ± 0.434	1.4862 ± 0.36	2.6063 ± 0.503

De acuerdo con los resultados presentados, la luz, tiene una influencia directa sobre la acumulación de luteína en *S. incrassatulus.* Con el proceso de fotoinducción se logra aumentar el contenido de carotenoides totales y la proporción de luteína en ellos, sin embargo, es notorio que el nivel de irradiación puede contribuir a mejorar la proporción de luteína dentro de los carotenoides totales. En la estrategia empleada para la fotoinducción no se tuvieron en cuenta diferentes niveles de irradiación, sino que se consideró un valor suficiente ~200 µmol fot m^{-2} s^{-1} ya que es la irradiación reportada para la producción de luteína con esta microalga (García-Cañedo et al., 2016). Sin embargo, el aumento en la concentración de biomasa limita la penetración de la luz y por lo tanto, no se puede asegurar que todas la células reciban la irradiación suficiente para estimular la producción y acumulación de luteína. De acuerdo con Chen y Johns (1995) a una densidad celular de 30 g L^{-1} la penetración de la luz es de tan solo 2 mm, por lo tanto, a altas densidades celulares, la eficiencia de la fotoinducción dependerá no solo del nivel de irradiación sino de las condiciones de mezclado que permitan la exposición de todo el cultivo a luz y del tiempo de exposición, para lograr el estímulo adecuado sobre la maquinaria de biosíntesis de pigmentos. Adicionalmente, para que todos estos factores puedan ser evaluados sobre la fotoinducción de un cultivo con una densidad celular elevada, es necesario asegurar que la microalga, no se encuentre limitada por sustrato, como ocurrió en el cultivo durante la fotoinducción, lo que se reflejó, en la disminución de la concentración celular durante el tiempo de exposición a la luz. Un comportamiento similar fue reportado por Fan et al. (2012) en un cultivo secuencial de *Chlorella*, y se atribuye a un desbalance nutricional al que se enfrentan la células al pasar de un metabolismo orgánico a un metabolismo inorgánico, si a esto se le suma la demanda de energía y nutrientes que el cultivo tiene para su mantenimiento, es notorio que con la limitada irradiación que el cultivo recibe y con el CO_2, meramente proveniente del aire inyectado al cultivo, no es suficiente para suplir su requerimiento. Dentro de las estrategias que se podría evaluar para evitar el desbalance nutricional del cultivo, están, la fotoinducción con adición de CO_2 al cultivo o bien la fotoinducción mixotrófica.

El análisis químico proximal de la biomasa de *S. incrassatulus,* obtenida en el proceso TSHP, presentado en la tabla 18, muestra cambios en la composición de la biomasa relacionados con el paso del cultivo de la oscuridad a la luz. De forma diferente a los reportado para *C. vulgaris,* por Fan et al. (2012), durante la fotoinducción la fracción de lípidos y proteínas disminuye,

mientras se incrementan los carbohidratos, este comportamiento refleja una respuesta metabólica a la disminución del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo. Diferentes estudios soportan que en bajas concentraciones de nitrógeno las microalgas pueden acumular lípidos o almidón como compuestos de reserva (Li et al., 2015; Rodolfi et al., 2009), en estudios anteriores del grupo de trabajo se ha evaluado la capacidad de *S. incrassatulus* para acumular lípidos (Arias-Peñaranda et al., 2013), sin embargo los resultados obtenidos (19.5% lípidos en PS) no son comparables a lo reportado para cepas oleaginosas que pueden acumular arriba de 40% lípidos en base seca (Ren et al., 2013; Li et al. 2014), lo que puede indicar que la regulación metabólica de *S. incrassatulus* se encuentra orientada a la acumulación de almidón como principal compuesto de reserva.

Tabla 18. Cambio en la composición de la biomasa de *S. incrassatulus* durante el proceso secuencial TSHP.

Componente	**Heterotrofia**	**Fotoinducción**	**Cambio neto en la fracción celular**
Lipidos (%)	9.09	7.81	↓1.28
Proteína (%)	39.39	33.36	↓13.14
Fibra (%)	1.41	1.67	↑0.25
Cenizas (%)	3.03	2.08	↓0.95
Carbohidratos (%)	47.07	62.5	↑15.43

EVALUACIÓN DE LA BIOMASA DE *S. incrassatulus* COMO FUENTE DE LUTEÍNA PARA LA PIGMENTACIÓN DE LA YEMA DE HUEVO

La biomasa de *S. incrassatulus* obtenida mediante el proceso de cultivo TSHP, se utilizó como fuente de pigmento en la dieta de gallinas ponedoras y se evaluó la coloración de la yema de huevo, así como la concentración de luteína en la misma, frente a los niveles alcanzados con el pigmento comercial. Los resultados presentados en la tabla 19, muestran que, a partir de la

primera semana de ensayo, la coloración de la yema de huevos provenientes de gallinas alimentadas con biomasa microalgal, como pigmentante (T3), fue similar a la coloración de la yema de huevos producidos por gallinas, alimentadas con pigmento comercial en su dieta (T2). La tonalidad presentada por las yemas fue amarilla, con un grado de intensidad visual de 7, lo que se considera aceptable por los consumidores. Sin embargo, de acuerdo con lo reportado por diferentes autores, los consumidores prefieren yemas con tonalidades amarillo-naranja, con graduaciones 12 y 13 del abanico Roche, las cuales se alcanzan suplementando las dietas con una alta cantidad de luteína en el alimento o bien combinado xantofilas amarillas y rojas (astaxantina, cantaxantina) para la pigmentación de la yema (Avila and Cuca, 1974; Esfahani-Mashhour et al., 2009; Leeson and Caston, 2004). La coloración amarilla se obtiene con una adición de 6-8 ppm de xantofilas (luteina) considerando la fuente de pigmento el extracto saponificado de cempasúchil (Cuca et al., 2009; Esfahani-Mashhour et al., 2009), sin embargo, de acuerdo con los resultados al utilizar la biomasa de *S. incrassatulus* como fuente de pigmento la coloración amarilla se alcanza con un aporte de ~4 ppm de luteína, adicionalmente el contenido de carotenoides totales y de luteína fue mayor en el tratamiento con biomasa de *S. incrassatulus* en comparación al pigmento comercial, esto indica que hay una mayor eficiencia de conversión de la luteína a partir de la biomasa microalgal en comparación al extracto de cempasúchil. Resultados similares fueron obtenidos por Kotrbacek et al. (2013), al suplementar la dieta de gallinas ponedoras con biomasa de *Chlorella* al 1 y 2%, siendo la luteína y la zeaxantina las principales xantofilas en la yema de huevo. Los resultados obtenidos, apoyan la estrategia de utilizar biomasa microalgal como fuente de pigmentos para la industria avícola y establece el potencial de la biomasa de *S. incrassatulus*, como fuente de luteína para la pigmentación de la yema de huevo.

Tabla 19. Evaluación de la coloración y el contenido de pigmentos en la yema de huevo. Los resultados con superíndice distinto en cada columna, indican que son significativamente diferentes de acuerdo con el análisis estadístico.

Muestra	**Intensidad del color (Colorímetro MINOLTA®)**	**Carotenoides totales (mg/huevo) (Espectofotometría)**	**Luteína (mg/huevo) (Cromatografía líquida de alta resolución)**
Semana 0	1.5^{a}	$0.038 \pm 7x10^{-4a}$	0.016 ± 0.005^{a}
Semana 1			
T1	2.67 ± 0.62^{b}	----	----
T2	6.27 ± 1.33^{c}	----	----
T3	7.40 ± 0.51^{d}	----	----
Semana 2			
T1	2.33 ± 0.98^{b}	----	----
T2	6.13 ± 0.83^{c}	----	----
T3	7.53 ± 0.52^{d}	----	----
Semana 3			
T1	2.40 ± 0.99^{b}	0.050 ± 0.003^{a}	0.017 ± 0.006^{a}
T2	6.80 ± 0.68^{cd}	0.264 ± 0.005^{b}	0.316 ± 0.013^{b}
T3	6.80 ± 0.68^{cd}	0.453 ± 0.004^{c}	0.382 ± 0.021^{c}

CONCLUSIONES

La estrategia de cultivo secuencial heterotrofía/autotrofía, permitió mejorar la productividad de biomasa y de luteína de *Scenedesmus incrassatulus*, en comparación con las obtenidas en cultivo autotrófico en lote alimentado. Durante la fase heterotrófica, se logró incrementar considerablemente la producción de biomasa, mediante la optimización de la concentración de glucosa y urea en el medio de cultivo y se alcanzaron altas densidades celulares (>30 g L^{-1}). Adicionalmente, en la fase de fotoinducción autotrófica, el contenido de pigmentos fotosintéticos y específicamente el contenido de luteína aumentó favoreciendo su productividad.

Por otra parte, los ensayos de suplementación de dietas de gallinas ponedoras con biomasa de *S. incrassatulus,* demostraron que la biomasa obtenida mediante el proceso secuencial, fue una buena fuente de pigmentos para la coloración de la yema de huevo y establece un precedente para la transferencia y aplicación de la tecnología de cultivo de microalgas en un importante sector de la industria mexicana.

PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo incluyendo la adición de vitaminas sobre la producción de biomasa y metabolitos de *S. incrassatulus* en heterotrofía, con miras a optimizar el cultivo heterotrófico para la obtención de metabolitos específicos.

Determinar las mejores condiciones hidrodinámicas para el crecimiento de *S. incrassatulus* en diferentes configuraciones de reactor y sistemas de agitación que faciliten la utilización comercial de *S. incrassatulus* en diferentes bioprocesos.

Evaluar diferentes condiciones de irradiación y de adición de nutrientes (N y C) en la etapa de fotoinducción que permitan una mayor recuperación del contenido de luteína en la biomasa de *S. incrassatulus.*

Continuar con los ensayos de adición de biomasa de *S. incrassatulus* a dietas de gallinas y pollos de engorda evaluando no solo la pigmentación de la yema de huevo sino la pigmentación de los tegumentos y el efecto de la biomasa sobre la calidad nutricional del huevo y la carne de las aves.

BIBLIOGRAFÍA

Abeliovich, A., Weisman, D., (1978) Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds. Applied and Environmental Microbiology 35, 32-37.

Anderson, S.L., McIntosh, L., (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. Journal of Bacteriology 173, 2761-2767.

Arias-Peñaranda, M.T., Cristiani-Urbina, E., Montes-Horcasitas, C., Esparza-Garcia, F., Torzillo, G., Canizares-Villanueva, R.O., (2013) *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01: a potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. Bioresourse Technology 140, 158-164.

Asensi-Fabado, M.A., Munne-Bosch, S., (2010) Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. Trends in Plant Science 15, 582-592.

Avila, E., Cuca, M., (1974) Efecto de la alga *Spirulina gcitleri* sobre la pigmentación de la yema de huevo. Técnica Pecuaria 26, 47-48.

Baird, M.E., Middleton, J.H., (2004) On relating physical limits to the carbon: nitrogen ratio of unicellular algae and benthic plants. Journal of Marine Systems 49, 169-175.

Blanco, A.M., Moreno, J., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., (2007) Outdoor cultivation of lutein-rich cells of Muriellopsis sp. in open ponds. Applied Microbiology and Biotechnology 73, 1259-1266.

Breithaupt, D.E., (2007) Modern application of xanthophylls in animal feeding – a review. Trends in Food Science & Technology 18, 501-506.

Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., Kovar, K., (2011) Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. Applied Microbiology and Biotechnology 91, 31-46.

Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E., (2007) Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 146, 60-78.

Carvalho, A., Pontes, I., Gaspar, H., Malcata, F.X., (2006) Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. Enzyme and Microbial Technology 38, 358-366.

Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J.M., Flores-Cotera, L.B., Cañizares-Villanueva, R.O., (2003) AVANCES EN EL DISEÑO CONCEPTUAL DE FOTOBIORREACTORES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS. Interciencia 28, 450-456.

Croft, M.T., Warren, M.J., Smith, A.G., (2006) Algae need their vitamins. Eukaryotic Cell 5, 1175-1183.

Chemeris, Y.K., Korolkov, N.S., Seifullina, N.K., Rubin, A.B., (2004) Oxygen-Evolving System of Inactive Photosystem II Complexes in *Chlorella*. Russian Journal of Plant Physiology 51, 584-589.

Chen, F., (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends in Biotechnology 14, 421-426.

Chen, F., Johns, M.R., (1995) A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. Journal of Applied Phycology 7, 43-46.

Chisti, Y., (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25, 294-306.
Choochote, W., Paiboonsin, K., Ruangpan, S., Pharuang, A., (2010) Effects of Urea and Light Intensity on the Growth of *Chlorella* sp. The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology
De Swaaf, M.E., Sijtsma, L., Pronk, J.T., (2003) High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Crypthecodinium cohnii*. Biotechnology and Bioengineering 81, 666-672.
Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., (2000) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). Journal of Biotechnology 76, 51-59.
Del Campo, J.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., (2001) Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology 85, 289-295.
Del Campo, J.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Applied Microbiology and Biotechnology 64, 848-854.
Desouky, S., (2011) Response of vitamins on the growth criteria and some metabolic activites of stressed *Scenedesmus obliquus* cultures. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 5, 89-99.
Dineshkumar, R., Dhanarajan, G., Dash, S.K., Sen, R., (2015) An advanced hybrid medium optimization strategy for the enhanced productivity of lutein in *Chlorella minutissima.* Algal Research 7, 24-32.
Doucha, J., Lívanský, K., (2012) Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. Journal of Applied Phycology 24, 35-43.
Esfahani-Mashhour, M., Moravej, H., Mehrabani-Yeganeh, H., Razavi, S.H., (2009) Evaluation of Coloring Potential of *Dietzia natronolimnaea* Biomass as Source of Canthaxanthin for Egg Yolk Pigmentation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 22, 254-259.
Fan, J., Huang, J., Li, Y., Han, F., Wang, J., Li, X., Wang, W., Li, S., (2012) Sequential heterotrophy–dilution–photoinduction cultivation for efficient microalgal biomass and lipid production. Bioresource Technology 112, 206-211.
Fernandez-Sevilla, J.M., Acien Fernandez, F.G., Molina Grima, E., (2010) Biotechnological production of lutein and its applications. Applied Microbiology and Biotechnology 86, 27-40.
Flórez-Miranda, L., (2010) PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS POR MICROALGAS NATIVAS DE AGUA DULCE. Tesis de Maestría. Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados el Instituto Politécnico Nacional, México.
García-Cañedo, J.C., Cristiani-Urbina, E., Flores-Ortiz, C.M., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., Cañizares-Villanueva, R.O., (2016) Batch and fed-batch culture of *Scenedesmus incrassatulus*: Effect over biomass, carotenoid profile and concentration, photosynthetic efficiency and non-photochemical quenching. Algal Research 13, 41-52.
García Camacho, F., Contreras Gómez, A., Mazzuca Sobczuk, T., Molina Grima, E., (2000) Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. Process Biochemistry 35, 1045-1050.
Gladue, R.M., Maxey, J.E., (1994) Microalgal feeds for aquaculture. Journal of Applied Phycology 6, 131-141.

Gons, H.J., Mur, L.R., (1980) Energy requirements for growth and maintenance of *Scenedesmus protuberans* Fritsch in light-limited cultures. Archives of Microbiology 125, 9-17.

Grant, M.A., Kazamia, E., Cicuta, P., Smith, A.G., (2014) Direct exchange of vitamin B12 is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal-bacterial cocultures. ISME Journal 8, 1418-1427.

Guenther, J.E., Nemson, J.A., Melis, A., (1990) Development of Photosystem II in dark grown *Chlamydomonas reinhardtii.* A light-dependent conversion of PS IIbeta, Q B-nonreducing centers to the PS II alpha, Q B-reducing form. Photosynthesis Research 24, 35-46.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B., (2010) Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. Applied Biochemistry and Biotechnology 162, 1978-1995.

Hernandez-Zamora, M., Perales-Vela, H.V., Flores-Ortiz, C.M., Canizares-Villanueva, R.O., (2014) Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to Congo red. Ecotoxicology and Environmental Safety 108, 72-77.

Hernández, M., Vázquez, M.A., (1999) Industrias Bachoco: estrategias de localización y competitividad ante el nuevo escenario avícola. Región y Sociedad 21, 27-51.

Hodaifa, G., Martínez, M.E., Sánchez, S., (2010) Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium. Engineering in Life Sciences 10, 257-264.

Hodson, R.C., Williams, S.K., 2nd, Davidson, W.R., Jr., (1975) Metabolic control of urea catabolism in *Chlamydomonas reinhardi* and *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Bacteriology 121, 1022-1035.

Jacome-Pilco, C.R., Cristiani-Urbina, E., Flores-Cotera, L.B., Velasco-Garcia, R., Ponce-Noyola, T., Canizares-Villanueva, R.O., (2009) Continuous Cr(VI) removal by *Scenedesmus incrassatulus* in an airlift photobioreactor. Bioresource Technology 100, 2388-2391.

Jin, E., E W Polle, J., Lee, H.K., Sang, M., Hyun, Man Chang, A., (2003) Xanthophylls in microalgae: From Biosynthesis to biotechnological mass production and application. Microbial Biotechnology 13, 165-174.

Kebede-Westhead, E., Pizarro, C., Mulbry, W.W., (2006) Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. Journal of Applied Phycology 18, 41-46.

Kotrbacek, V., Skrivan, M., Kopecky, J., Penkava, O., Hudeckova, P., Uhrikova, I., Doubek, J., (2013) Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*. Czech Journal of Animal Science 58, 193-200.

Lee, Y.K., (2004) Algal Nutrition–Heterotrophic Carbon Nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 116-124.

Leeson, S., Caston, L., (2004) Enrichment of eggs with lutein. Poultry science 83, 1709-1712.

Leupold, M., Hindersin, S., Gust, G., Kerner, M., Hanelt, D., (2013) Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Applied Phycology 25, 485-495.

Li, X., Xu, H., Wu, Q., (2007) Large-Scale Biodiesel Production From Microalga *Chlorella protothecoides* Through Heterotrophic Cultivation in Bioreactors. Biotechnology and Bioengineering 98, 764-771.

Li, Y., Xu, H., Han, F., Mu, J., Chen, D., Feng, B., Zeng, H., (2015) Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy-photoinduction cultivation regime. Bioresource Technology 192, 781-791.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.

Lin, J.H., Lee, D.J., Chang, J.S., (2015) Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae. Bioresource Technology 184, 421-428.

Mandalam, R.K., Palsson, B.O., (1998) Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. Biotechnology and Bioengineering 59, 605-611.

Margalith, P., (1999) Production of ketocarotenoids by microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 51, 431-438.

Molina, E., Fernández, J.M., Acién, F.G., Sánchez, J.F., García, J., Magán, J.J., Pérez, J., (2005) Production of lutein from the microalga *Scenedesmus almeriensis* in an industrial size photobioreactor: case study.

Mulholland, M.R., Lee, C., (2009) Peptide hydrolysis and the uptake of dipeptides by phytoplankton. Limnology and Oceanography 54, 856-868.

Ogawa, T., Aiba, S., (1981) Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. Biotechnology and Bioengineering 23, 1121-1132.

Ogbonna, J.C., Masui, H., Tanaka, H., (1997) Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation–an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. Journal of Applied Phycology 9, 359-366.

Ogbonna, J.C., Tanaka, H., (1998) Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. Bioresource Technology 65, 65-72.

Oh-Hama, T., Miyachi, S., (1992) *Chlorella*. In: Borowitzka, M., Borowitzka, L. (Eds.), Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 3-26.

Ordaz, L., Orozco, C., (1998) Ingeniería de fermentaciones. Instituto Politécnico Nacional, México.

Perales, H.V., (2008) Caracterización fotosintética y respiratoria de *Scenedesmus incrassatulus* durante la biorremoción de Cu2+. Tesis de Doctorado. Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México

Perez-Garcia, O., Escalante, F.M., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water Research 45, 11-36.

Pizarro Arcos, L., Stange, C., (2009) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Ciencia e Investigación Agraria 36, 143-162.

Ren, H.Y., Liu, B.F., Ma, C., Zhao, L., Ren, N.Q., (2013) A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. Biotechnology for Biofuels 6, 143.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering 102, 100-112.

Rodriguez-Villalon, A., Gas, E., Rodriguez-Concepcion, M., (2009) Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. Plant Signaling & Behavior 4, 965-967.

Sánchez, J.F., Fernandez-Sevilla, J.M., Acien, F.G., Ceron, M.C., Perez-Parra, J., Molina-Grima, E., (2008a) Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis:* influence of irradiance, dilution rate and temperature. Applied Microbiology and Biotechnology 79, 719-729.

Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Acién, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., Molina, E., (2008b) Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. Process Biochemistry 43, 398-405.

Shen, Y., Pei, Z.J., Yuan, W., Mao, E., (2009) Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. Internacional Journal of Agricultural and Biological Engineering 2, 51.

Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z., Mao, E., (2010) Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. Applied Biochemistry and Biotechnology 160, 1674-1684.

Shi, X.-M., Liu, H.-J., Zhang, X.-W., Chen, F., (1999) Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. Process Biochemistry 34, 341-347.

Shi, X.-M., Zhang, X.-W., Chen, F., (2000) Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. Enzyme and Microbial Technology 27, 312-318.

Shi, X.M., Jiang, Y., Chen, F., (2002) High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. Biotechnology Progress 18, 723-727.

Strasser, B.J., Strasser, R.J., (1995) Measuring fast fluorescence trasients to address environmental questions: The JIP test. In: Manthis, P. (Ed.), Photosynthesis: from Light to Biosphere. Kluwer Academic, The Netherlands, pp. 977-980.

Tabei, Y., Okada, K., Horii, E., Mitsui, M., Nagashima, Y., Sakai, T., Yoshida, T., Kamiya, A., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., (2012) Two regulatory networks mediated by light and glucose involved in glycolytic gene expression in cyanobacteria. Plant and Cell Physiology 53, 1720-1727.

Tabei, Y., Okada, K., Makita, N., Tsuzuki, M., (2009) Light-induced gene expression of fructose 1,6-bisphosphate aldolase during heterotrophic growth in a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. The FEBS Journal 276, 187-198.

Urbina, N., (2010) Establecimiento del cultivo mixotrófico de *Scenedesmus incrassatulus* para la producción de carotenoides en un fotobiorreactor multitubular. Tesis de maestría. Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.

Wang, M., Tsao, R., Zhang, S., Dong, Z., Yang, R., Gong, J., Pei, Y., (2006) Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. Food and Chemical Toxicology 44, 1522-1529.

Watanabe, M.M., (2005) Freshwater Culture. In: Andersen, R.A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 13-20.

Wei, D., Chen, F., Chen, G., Zhang, X., Liu, L., Zhang, H., (2008) Enhanced production of lutein in heterotrophic *Chlorella protothecoides* by oxidative stress. Science in China Series C: Life Sciences 51, 1088-1093.

Welter, C., Schwenk, J., Kanani, B., Van Blargan, J., Belovich, J., (2013) Minimal Medium for Optimal Growth and Lipid Production of the Microalgae *Scenedesmus dimorphus*. Environmental Progress & Sustainable Energy 32, 937-945.

Wen, Z.-Y., Chen, F., (2001) Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. Enzyme and Microbial Technology 29, 341-347.

Wu, L., Huang, X., Shi, K., Tan, R., (2009) Bioavailability comparison of free and esterified lutein for layer hens. Revista Brasileira de Ciência Avícola 11, 95-98.

Wu, Z.-Y., Shi, C.-L., Shi, X.-M., (2007) Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23, 1233-1238.

Wu, Z., Shi, X., (2007) Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. Letters in Applied Microbiology 44, 13-18.

Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q., (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 78, 29-36.

Yatzidis, H., Garidi, M., Vassilikos, C., Mayopoulou, D., Akilas, A., (1964) An improved method for the simple and accurate colorimetric determination of urea with Ehrlich's reagent. Journal of Clinical Pathology 17, 163-164.

Yen, H.-W., Sun, C.-H., Ma, T.-W., (2011) The Comparison of Lutein Production by *Scenesdesmus* sp. in the Autotrophic and the Mixotrophic Cultivation. Applied Biochemistry and Biotechnology 164, 353-361.

Yoshida, F., Yamane, T., Nakamoto, K.-I., (1973) Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. Biotechnology and Bioengineering 15, 257-270.