



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Escalamiento de un cultivo por lote alimentado de la microalga**

***Scenedesmus incrassatulus* para la producción de luteína**

TESIS

Que presenta

**M.C. JUAN CRISTÓBAL GARCÍA CAÑEDO**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGIA**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. ROSA OLIVIA CAÑIZARES VILLANUEVA**

**CIUDAD DE MEXICO**

**ABRIL 2017**

Le dedico esta tesis a mi padre, madre  
y mi familia, quienes me apoyaron  
y brindaron los ánimos  
necesarios para continuar esforzandome

Agradezco a las autoridades del CINVESTAV, al comité tutorial y a todas las  
personas que me ayudaron durante mis estudios de doctorado

Two lessons I have learned during my research career are the importance of following up unexpected observations and realizing that the most obvious interpretation of such observations can be rational but wrong. When you carry out an experiment there is usually an expectation that the result will fall within a range of predictable outcomes, and it is natural to feel pleased when this turns out to be the case. In my view this response is a mistake. What you should be hoping for is a puzzling result that was not anticipated since with persistence and luck further experiments may uncover something new.

Ellis R. J. (2005).

**From chloroplasts to chaperones: how one thing led to another.**

Govindjee, J. T. Beatty, H. Gest and J.F. Allen (eds.):  
*Discoveries in Photosynthesis*, pp. 745–755.

La carrera científica tiene amarguras y frustraciones pero también grandes goces y recompensas y resulta una actividad fascinante.

Medawar P. B. Consejos a un joven científico. 2011

# Contenido

RESUMEN.....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. Las microalgas .....	11
1.1.1. ¿Qué son las microalgas? .....	11
1.1.2. Evolución de los sistemas fotosintéticos .....	12
1.1.3. Aprovechamiento de la luz solar para la producción de metabolitos mediante el cultivo de microalgas.....	13
1.1.4. Potencial biotecnológico de las microalgas.....	15
1.2. Scenedesmus.....	17
1.3. Luteína.....	17
1.3.1. Luteína y su función en sistemas fotosintéticos .....	18
1.3.2. Aplicaciones de la luteína en la salud humana y en la industria de alimentos..	20
1.4. Carotenoides, nutrientes y cultivo por lote alimentado .....	22
1.4.1. Nutrientes y lote alimentado .....	22
1.4.2. Fluorescencia de la clorofila a, herramienta que ayuda a monitorear el aprovechamiento de luz y nutrientes.....	26
1.5. Cultivo de microalgas, captación de luz y su relación con los parámetros de fluorescencia .....	27
1.6. Producción industrial de microalgas y escalamiento para la producción de luteína	29
1.6.1. Producción de microalgas a gran escala en fotobiorreactores .....	31
1.6.2. Escalamiento de sistemas para la producción de luteína a partir de microalgas .....	34
2. JUSTIFICACIÓN .....	36
3. HIPOTESIS .....	38
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo general.....	38
4.2. Objetivos específicos .....	38
5. METODOLOGÍA.....	39
5.1. Microorganismo, condiciones de mantenimiento y experimentación .....	39
5.1.1. Cepa y condiciones de cultivo.....	39
5.1.2. Condiciones de experimentación.....	39

5.2. Procedimientos analíticos.....	41
5.2.1 Peso seco .....	41
5.2.2. Conteo celular .....	42
5.2.3. Medición del flujo fotónico.....	42
5.2.4. Cuantificación de la emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	42
5.2.5. Cuantificación de nitrógeno de nitratos.....	43
5.2.6. Cuantificación de fosfatos .....	43
5.2.7. Contenido intracelular de N y P .....	44
5.2.8. Cuantificación de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> y carotenoides totales.....	44
5.2.9. Cuantificación e identificación de xantofilas totales por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) .....	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
6.1. Concentración y consumo acumulado de nutrientes .....	47
6.1.1. Concentración de nitrógeno en el medio .....	47
6.1.2. Concentración de fosfato en el medio.....	50
6.1.3. Consumo acumulado de nutrientes.....	52
6.1.4. Contenido intracelular de nutrientes y la relación Redfield N/P.....	56
6.2. Condiciones ambientales de luz y temperatura a la intemperie.....	62
6.3. Crecimiento.....	66
6.3.1. En base a peso seco .....	66
6.3.2. Productividad de biomasa.....	70
6.3.3. En base a conteo celular .....	72
6.3.4. Velocidad específica de crecimiento .....	75
6.4. Parámetros de fluorescencia .....	78
6.4.1. Eficiencia fotosintética máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ).....	78
6.4.2. Eficiencia fotosintética operacional del fotosistema II ( $F_q'/F_m'$ ) .....	81
6.4.3. Non photochemical quenching (NPQ).....	84
6.4.4. Rutas alternas al flujo de electrones posible explicación sobre los resultados obtenidos de los parámetros de fluorescencia en lote alimentado.....	88
6.4.5. Índice de desempeño fotosintético (PI).....	94
6.4.5.1. Tamaño relativo de la antena que sirve a cada centro de reacción (RC/ABS) .....	98

6.4.5.2. Contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria del PSII ( $F_v/F_0$ ) .....	101
6.4.5.3. Fuerza de las reacciones de la oscuridad de la fotosíntesis ( $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ ) ...	102
6.4.6. Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a $F_0$ y $F_m$ .....	104
6.5. Pigmentos .....	108
6.5.1. Concentración volumétrica de carotenoides totales, clorofila total, clorofila <i>a</i> y clorofila <i>b</i> .....	108
6.5.2. Contenido específico de carotenoides totales, clorofila <i>a</i> y clorofila <i>b</i> .....	115
6.5.3. Relación de pigmentos Clorofila <i>a</i> /Clorofila <i>b</i> y Carotenoides totales/Clorofila total .....	121
6.5.4. Concentración volumétrica de luteína.....	123
6.5.5. Contenido específico de luteína.....	126
6.5.6. Productividad de luteína.....	129
6.5.7. Productividad de xantofilas totales .....	134
6.5.8. Productividad de carotenoides totales extraídos con acetona .....	138
6.6. Rendimientos de biomasa y pigmentos con respecto a nitrógeno y fósforo.....	139
7. CONCLUSIONES .....	146
8. RECOMENDACIONES .....	148
9. REFERENCIAS.....	149
10. ANEXO 1. Análisis de varianza de las productividades de luteína en escala laboratorio y escala piloto en condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie. ....	165
11. ANEXO 2. Perfil de xantofilas de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> .....	166
12. ANEXO 3. Diagrama de fotobiorreactor tubular vertical de 40L. ....	173

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación esquemática de los eventos de endosimbiosis primaria y secundaria .....	12
Figura 2. Estructura de la luteína (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). ....	18
Figura 3. Estructura de la antena fotorreceptora y funciones de las xantofilas en plantas superiores (Liu <i>et al.</i> , 2004). ....	19
Figura 4. Concentración de nitrógeno (N) en el medio de cultivo.....	48
Figura 5. Concentración de fosfato ( $PO_4$ ) en el medio de cultivo.....	51
Figura 6. Velocidad de consumo acumulado de nitrógeno en cultivo por lote. ....	53
Figura 7. Velocidad de consumo acumulado de nitrógeno, en cultivo por lote alimentado en escala laboratorio y piloto, en condiciones controladas y a la intemperie. ....	53

Figura 8. Velocidad de consumo acumulado de fosfato, en cultivo por lote.....	55
Figura 9. Velocidad de consumo acumulado de fosfato, en cultivo por lote alimentado. ...	55
Figura 10. Crecimiento en base a peso seco .....	67
Figura 11. Crecimiento en base a conteo celular.....	73
Figura 12. Cinéticas de crecimiento en base a logaritmo natural (Ln) de peso seco.....	76
Figura 13. Eficiencia fotosintética máxima del fotosistema II.....	79
Figura 14. Eficiencia fotosintética operacional del fotosistema II. ....	82
Figura 15. Decaimiento no fotoquímico (NPQ).....	85
Figura 16. Índice de desempeño de la fotosíntesis (PI).....	97
Figura 17. RC/ABS (cantidad de centros de reacción por absorción promedio de flujo fotónico) .....	99
Figura 18. Contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria Fv/Fo. ....	102
Figura 19. Fuerza de las reacciones de oscuridad de la fotosíntesis ( $\psi_o/(1 - \psi_o)$ ) .....	103
Figura 20. Cinética de fluorescencia típica de plantas y algas clorofíceas (Henriques, 2009). ....	104
Figura 21. Cinética de fluorescencia típica de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> a diferentes tiempos de cultivo.....	105
Figura 22. Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a Fo y Fm en cultivo por lote. .....	106
Figura 23. Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a Fo y Fm en cultivo por lote alimentado en escala laboratorio. ....	107
Figura 24. Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a Fo y Fm (V1ms) en cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y escala piloto, en condiciones controladas y a la intemperie.....	107
Figura 25. Concentración volumétrica de carotenoides totales .....	110
Figura 26. Concentración volumétrica de clorofila total .....	112
Figura 27. Concentración volumétrica de clorofila a.....	114
Figura 28. Concentración volumétrica de clorofila b.....	115
Figura 29. Contenido específico de carotenoides totales .....	117
Figura 30. Contenido específico de clorofila a.....	119
Figura 31. Contenido específico de clorofila b.....	120
Figura 32. Relación clorofila a / clorofila b. ....	121
Figura 33. Relación carotenoides totales/ clorofila total.....	122
Figura 35. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote, Lote baja. .	167
Figura 36. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote, Lote media. .....	167
Figura 37. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote, Lote alta....	168
Figura 38. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote alimentado, LA baja. ....	170
Figura 39. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote alimentado, LA media.....	170

Figura 40. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote alimentado, LA alta. ....	170
Figura 41. Perfil de xantofilas totales <i>S. incrassatulus</i> en cultivo por lote alimentado, LA baja de igual masa total de N a LA alta. ....	171
Figura 42. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en lote alimentado, LA pulsos pulsos. ....	171
Figura 43. Perfil de xantofilas totales de <i>S. incrassatulus</i> en lote alimentado por pulsos en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio.....	172
Figura 44. Perfil de xantofilas totales de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> en lote alimentado por pulsos en escala piloto a la intemperie. ....	172
Figura 21. Cinética de fluorescencia típica de plantas y algas clorofíceas (Henriques, 2009).INSTALACIONES ADICIONALES REQUERIDAS:.....	173

Tabla 1. Comparación de la composición general de algunas fuentes de alimentos humanos y algas (% de materia seca).....	30
Tabla 2. Intervalo de porcentaje intracelular de nitrógeno y fósforo en base a peso seco y relación Redfield en microalgas en diferentes modos de cultivo.....	57
Tabla 3. Composición elemental y porcentaje de masa celular de microalgas asociada a diferentes componentes moleculares que contienen nitrógeno y/o fósforo.....	60
Tabla 4. Condiciones ambientales durante cultivo a la intemperie verano.....	63
Tabla 5. Condiciones ambientales durante cultivo a la intemperie en otoño.....	63
Tabla 6. Irradiación solar a la intemperie en verano.....	64
Tabla 7. Irradiación solar a la intemperie en otoño.....	64
Tabla 8. Condiciones promedio de temperatura durante verano, en un día soleado a la intemperie.....	65
Tabla 9. Condiciones promedio de temperatura durante otoño, en un día soleado a la intemperie.....	65
Tabla 10. Productividad máxima de biomasa de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> .....	71
Tabla 11. Velocidad específica de crecimiento en cultivo por lote de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> . ....	76
Tabla 12. Velocidades específica de crecimiento en cultivo por lote alimentado de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> . En escala laboratorio, escala piloto, en condiciones de laboratorio y a la intemperie. ....	77
Tabla 13. Contenido de carotenoides totales de diferentes microalgas.....	118
Tabla 14. Concentración volumétrica de luteína determinada a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.....	124
Tabla 15. Contenido específico máximo de luteína determinado a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.....	127
Tabla 16. Contenido específico de luteína de diferentes especies de microalgas en diferentes sistemas de cultivo. ....	129
Tabla 17. Productividad volumétrica de luteína determinado a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia. ....	131

Tabla 18. Productividad de luteína por unidad de área determinado a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.....	133
Tabla 19. Productividad volumétrica de xantofilas determinada a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.....	135
Tabla 20. Productividad de xantofilas por unidad de área determinado a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina. ....	137
Tabla 21. Productividad por unidad de área de luteína de diferentes especies de microalgas y sistemas de cultivo. ....	137
Tabla 22. Productividad máxima de carotenoides totales, volumétrica y por unidad de área determinada a partir de las extracciones con acetona.....	139
Tabla 23. Rendimientos de biomasa con respecto a nitrógeno y fósforo de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie. ....	140
Tabla 24. Rendimientos de clorofila <i>a</i> con respecto a nitrógeno y fósforo de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie. ....	142
Tabla 25. Rendimientos de clorofila <i>b</i> con respecto a nitrógeno y fósforo de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie. ....	143
Tabla 26. Rendimientos de carotenoides totales con respecto a nitrógeno y fósforo de <i>Scenedesmus incrassatulus</i> en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie.....	145
Tabla 27. Absorbancias máximas características de carotenoides. ....	166

## RESUMEN

La cepa *Scenedemus incrassatulus* al ser producida en cultivo por lote alimentado acumula grandes cantidades de pigmentos carotenoides, principalmente luteína. La luteína es una xantofila, es decir, un carotenoide que posee oxígeno en su molécula y encuentra aplicación como aditivo alimentario en acuicultura y en la industria avícola. También es usada como ingrediente funcional y colorante natural de productos farmacéuticos, cosméticos y de alimentos. Asimismo, la luteína ayuda a prevenir o aminorar los efectos de diversas enfermedades degenerativas en humanos, tales como enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo, como el cáncer, y la degeneración relacionada con la edad de la mácula (región de la retina que capta la luz) en los ojos. Por lo anterior, el presente proyecto se enfocó al escalamiento del cultivo de *Scenedemus incrassatulus* para la producción de luteína utilizando lote alimentado. Los resultados indican que la implementación de cultivo por lote alimentado favoreció el crecimiento celular, obteniéndose altas concentraciones de biomasa de hasta 4 g/L en escala laboratorio y de 2.5 g/L en escala piloto (40 L). Mediante el cultivo por lote alimentado se obtuvieron altas eficiencias fotosintéticas máximas y operacionales con magnitudes de hasta 0.76 y 0.6, respectivamente, en ambas escalas de cultivo. El decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ) no presentó una relación directa de la concentración de pigmentos carotenoides al utilizar cultivo por lote alimentado. Tanto en cultivo por lote como en lote alimentado, al aumentar la concentración inicial de Nitrógeno aumentó la productividad de luteína. La implementación de cultivo por lote alimentado favoreció una mayor productividad volumétrica de luteína, en comparación con cultivo por lote. El escalamiento y la implementación del cultivo a la intemperie tuvieron un efecto negativo sobre la productividad de luteína. La productividad volumétrica de luteína de *Scenedesmus incrassatulus* en cultivo por lote alimentado no es constante al incrementar la escala de cultivo. La productividad de luteína en cultivo por lote alimentado posterior a su escalamiento fue superior en condiciones controladas de laboratorio que a la intemperie.

## ABSTRACT

The strain *Scenedesmus incrassatulus* when cultivated in fed batch culture is capable of accumulating large quantities of carotenoid pigments, primarily lutein. Lutein is a xanthophyll, or in other words, a carotenoid that possess oxygen in its molecule, and it is used as a food additive in the aquaculture and poultry industries. It is also used as a functional ingredient or colorant of pharmaceutical, cosmetic and foods. Additionally, lutein helps to prevent or reduce the effects of several degenerative illness in humans, such as oxidative stress chronic diseases, like cancer, and age related macular degeneration. Therefore, the present study was focused in scaling up the culture *Scenedesmus incrassatulus* for the production of lutein using fed batch culture. Results indicate that fed batch culture mode favour high cellular growth, obtaining high biomass concentrations of up to 4 g/L in laboratory scale and 2.5 g/L in pilot plant scale (40 L). With the use of fed batch culture high maximum and operational photosynthetic efficiencies were obtained, with magnitudes of 0.76 and 0.6, respectively, in both culture scales. Fluorescence non photochemical quenching (NPQ) showed no direct relationship with carotenoid pigments concentration, when using fed batch culture. In both, batch and fed batch cultures, increasing the initial nitrogen concentration resulted in an increase of lutein productivity. Fed batch culture implementation favour a higher lutein volumetric productivity, in comparison to batch culture. The scaling up and outdoor culture implementation had a negative effect over the magnitude of lutein productivity. Volumetric lutein productivity of *Scenedesmus incrassatulus* is not constant when culture is scale up using fed batch culture. Lutein productivity after scaling up in fed batch culture was higher in laboratory conditions than in outdoor conditions.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Las microalgas

### 1.1.1. ¿Qué son las microalgas?

En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga hace referencia a aquellos microorganismos unicelulares, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, que contienen clorofila *a* y/u otros pigmentos fotosintéticos similares. El término microalga engloba un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos, procariotas y eucariotas que catalizan el proceso de fijación del CO<sub>2</sub>, y lo convierten en materia orgánica (Falkowski, 2002). La ficología es la ciencia que estudia las algas. La palabra ficología se deriva de la palabra griega *phykos*, que significa planta marina. Durante cierto tiempo también se usó el término algología, pero ha desaparecido debido a que se parece al término *algogénico* que significa “productor de dolor” (Lee, 1992).

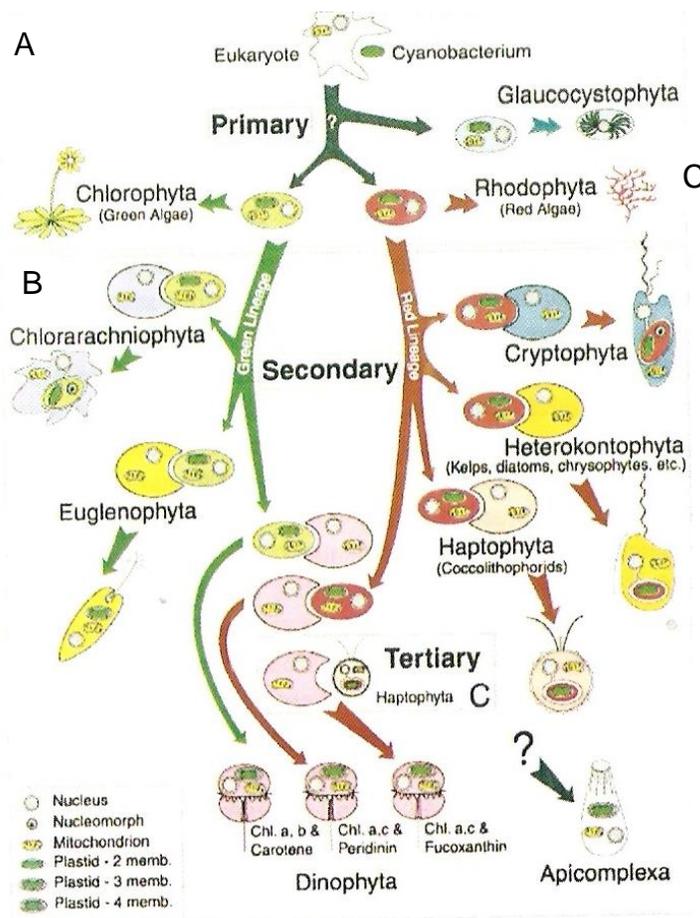
¿Cómo distinguimos a las algas de las plantas? Las algas son “Talofitas”, es decir, plantas que carecen de raíces, estomas, y hojas, que contienen clorofila *a* como el pigmento fotosintético primario y carecen de órganos reproductivos complejos (Lee, 1992). Las algas no forman embriones, todas las células de sus estructuras reproductivas son potencialmente fértiles y las células estériles con funciones protectoras se encuentran ausentes. El desarrollo de estructuras parenquimáticas está sólo presente en algunos grupos y finalmente éstas exhiben tanto reproducción sexual como asexual. En contraste, las plantas exhiben un elevado nivel de diferenciación (por ejemplo, raíces, hojas, estomas y red vascular xilema/floema) (Barsanti y Gualtieri, 2006; Barsanti y Paolo, 2014) además de otras características específicas.

La ficología ha presentado grandes e importantes cambios conceptuales desde el año 1950 debido al desarrollo de técnicas de microscopía electrónica y a nuevas técnicas de análisis bioquímicos de los componentes celulares y vías metabólicas. El incremento de la resolución de la microscopía electrónica ha revelado la presencia y estructura de flagelos, de estructuras sensibles a la luz (conocidas como “eyes pots”, en inglés), retículo endoplasmático de cloroplastos,

agrupamiento de cloroplastos, ficobilisomas, entre otras. Al mismo tiempo, los análisis bioquímicos han clarificado la presencia y estructura de pigmentos, productos de almacenamiento de energía y constituyentes de paredes celulares (Lee, 1992). Sin embargo, para entender las capacidades de las microalgas se requiere entender sus orígenes evolutivos.

### 1.1.2. Evolución de los sistemas fotosintéticos

El término alga es usado de manera genérica para designar a organismos eucariotes que comparten la fotoautotofía (mayoría de las especies de algas) y que carecen de las características de las plantas terrestres. De acuerdo a los tipos de pigmentos presentes en los cloroplastos se distinguen 3 líneas evolutivas (Fig.1):



**Figura 1.** Representación esquemática de los eventos de endosimbiosis primaria y secundaria, que dieron origen a las mayores divisiones taxonómicas de los organismos fotosintéticos oxigénicos. Todas las plantas terrestres se derivan de un eucariote verde de endosimbiosis primaria. La mayoría de los fotótrofos acuáticos dominantes se encuentran en el linaje de plástidos rojos y son simbiontes secundarios. (Archer y Barber, 2004).

A) Linaje azul de endosimbiosis primaria en la cual la clorofila a (Chl a) es el único tipo de clorofila y el cloroplasto contiene pared celular de peptidoglicanos, típico de cianobacterias.

- B) En el Linaje verde de endosimbiosis primaria la Chl *a* está asociada a la Chl *b*. A este linaje pertenecen las Clorofitas (más de 6,000 especies), de las cuales emergieron las plantas terrestres.
- C) Linaje rojo de endosimbiosis primaria en el cual la Chl *a* es también el único tipo de clorofila. Más de 6,000 especies pertenecen a este linaje, la mayoría unicelulares y marinas, incluyendo algunas algas marinas, algas rojas o Rodofitas (Archer y Barber, 2004).

Para explicar la presencia de membranas adicionales alrededor de los cloroplastos se piensa en un segundo evento de endosimbiosis. Los miembros del “linaje rojo de endosimbiosis secundaria” constituyen un muy diverso grupo de organismos, el más importante desde el punto de vista farmacéutico son las diatomeas (Heterokonta) y los dinoflagelados (Alveolata) (Mimouni *et al.*, 2012).

### **1.1.3. Aprovechamiento de la luz solar para la producción de metabolitos mediante el cultivo de microalgas**

La luz solar es la fuente de energía más abundante y sustentable que tenemos a nuestra disposición en el planeta Tierra (Sayre, 2010). Por lo tanto, se debe investigar cómo capturar, transferir y almacenar la energía solar de manera eficiente, debido a que se ha establecido que la misma puede proveer las futuras necesidades energéticas de la humanidad (Scholes *et al.*, 2011). Una de las formas de aprovechar la luz solar es mediante el cultivo de microalgas, debido a que las mismas realizan fotosíntesis y este proceso natural es el único que permite producir biomasa utilizando como fuente de energía la luz del sol y dióxido de carbono.

Los organismos fotoautotróficos unicelulares son capaces de usar la luz del sol de manera más eficiente que las plantas superiores (Janssen *et al.*, 2003). Las mayores ventajas del cultivo de microalgas con respecto a las plantas superiores son las siguientes (Vonshak, 1992; Janssen *et al.*, 2003; Barsanti *et al.*, 2008):

1. Los sistemas biológicos de las microalgas son considerados los más eficientes para la captación de la energía solar y la producción de compuestos por medio del proceso fotosintético.

2. Toda la biomasa se puede cosechar y utilizar, debido a que las microalgas son organismos no vasculares y carecen de órganos reproductivos complejos.
3. Muchas especies de algas pueden ser inducidas para producir altas concentraciones de compuestos específicos de valor comercial, como son proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos.
4. El aislamiento, selección genética, y estudio de cepas es poco laborioso, relativamente fácil y rápido, debido a que las microalgas son microorganismos que se reproducen por simple división celular y pueden completar su ciclo de vida en unas cuantas horas.
5. Las microalgas pueden cultivarse en aguas con baja concentración de nutrientes inorgánicos, lo que resulta de particular interés para asegurar el suministro de proteína en regiones de baja productividad agrícola debido a la poca disponibilidad de agua o suelos pobres en nutrientes.
6. Los sistemas de producción de biomasa de microalgas pueden ser adaptados fácilmente o escalados a diferentes niveles de operación, para su posterior incorporación a unidades totalmente automatizadas de producción intensiva.

La eficiencia termodinámica de uso de energía lumínica de microalgas sobre la región fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) en cultivos con luz moderada ( $100\text{--}300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pueden ser de 5%, disminuyendo a 2% cuando son expuestas a radiación solar alta ( $>500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Además, en las condiciones a la intemperie 95% de la luz es transformada a calor (Provust *et al.*, 2016).

Por medio de su actividad fotosintética las microalgas procesan más del 25% del carbono inorgánico disuelto en los océanos, y lo transforman a carbohidratos que finalmente, sirven de alimento a los niveles tróficos superiores. Las microalgas sintetizan moléculas bioactivas tales como pigmentos y lípidos que exhiben propiedades que benefician la salud. Adicionalmente, los estímulos abióticos como

alta irradiación de luz visible, baja concentración de nutrientes, alta radiación UV, entre otros, desencadenan reacciones metabólicas que resultan en la producción de compuestos específicos de interés, como son los ácidos grasos omega-3 o carotenoides. El incremento en la demanda de estos compuestos naturales, combinado con el decremento de los recursos pesqueros y tierra para uso agrícola, hace necesario la búsqueda de fuentes alternativas para este tipo de biomoléculas. Las microalgas poseen este gran potencial (Mimouni *et al.*, 2012).

#### **1.1.4. Potencial biotecnológico de las microalgas**

Desde la antigüedad, las algas han sido utilizadas como fertilizantes y alimentos. Las mismas poseen un gran potencial biotecnológico para la producción de una variedad de compuestos, tales como polisacáridos, lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), proteínas, carotenoides y otros pigmentos, vitaminas, esteroides, toxinas como ácido domoico, monoterpenos, compuestos farmacéuticos, además de biocombustibles, hidrocarburos e hidrógeno (Borowitzka, 1997; Cañizares y Perales, 2006; Mimouni *et al.*, 2012). Pueden ser una fuente limpia y renovable de energía, debido a sus altos rendimientos y a su bajo requerimiento de espacio, en comparación con las plantas terrestres. Algunos autores las consideran la fuente de biodiesel del futuro. Estos productos pueden ser sintetizados por las microalgas durante la fase de crecimiento exponencial (metabolitos primarios) o estacionaria (metabolitos secundarios), a partir de la luz solar y la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico. (Hariskos y Posten, 2014; De Andrade *et al.*, 2016).

Considerando el aumento en las necesidades de alimentación, bioenergía, compuestos farmacéuticos y cosméticos, en la última década se ha prestado atención particular a fuentes renovables que no compitan con las fuentes de alimentos tradicionales. Las microalgas son buenas candidatas para tales propósitos, y su diversificación evolutiva y adaptativa ha producido como resultado un amplio y diverso tipo de constituyentes bioquímicos. Las microalgas son microorganismos muy antiguos que han evolucionado durante miles de millones de años y por lo tanto presentan gran variedad de estrategias de adaptación al entorno. Apenas empezamos a estudiar su potencial. El desarrollo de procesos industriales

que utilizan las microalgas es todavía escaso ( $15 \times 10^6$  Ton biomasa/año) comparada con la producción del campo ( $4 \times 10^9$  Ton biomasa/año). Por lo tanto, la mejora del desempeño de los cultivos constituye la mejor vía para hacer a las microalgas competitivas reduciendo su costo de producción. Esto puede lograrse por medio de un profundo conocimiento de la bioquímica, fisiología e ingeniería del cultivo de las microalgas, que obviamente debe ir acompañada de un desarrollo de fotobiorreactores (Mimouni *et al.*, 2012).

Se cree que los océanos y cuerpos de agua contienen entre 5,000 a 10,000 especies de microalgas planctónicas, es decir algas que viven suspendidas en las regiones iluminadas de los cuerpos de agua, incluyendo las regiones polares. Éstas forman la base de la cadena alimenticia y producen hasta el 50% del oxígeno que inhalamos. De las especies que se cree existen, sólo unos cuantos miles de cepas son mantenidas en colecciones, unos cientos son investigadas por su contenido químico y únicamente algunas son cultivadas en cantidades industriales (toneladas por año, por ejemplo) (Spolaore *et al.*, 2006).

Las industrias de alimentos para humanos, animales, farmacéutica, cosmética y química se benefician de los productos microalgales.

La biomasa de microalgas encuentra diversas aplicaciones, una de ellas es la producción de pigmentos carotenoides (Cañizares y Perales, 2006). Algunas de las principales especies de microalgas que han sido empleadas para este fin son *Dunaliella salina* para producir  $\beta$ -caroteno (Hadi *et al.*, 2008), *Haematococcus pluvialis* para astaxantina (Lababpour *et al.*, 2005), *Muriellopsis* sp., *Chlorella protothecoides*, *Scenedesmus almeriensis*, *Desmodesmus* sp. y *Scenedesmus incrassatulus* para la producción de luteína (Shi *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008a; García-Cañedo, 2009; Xie *et al.*, 2013), sólo por mencionar algunas.

Debido a que se ha demostrado que la cepa *Scenedesmus incrassatulus* es una posible fuente de pigmentos carotenoides (García-Cañedo *et al.*, 2009), las cuales son moléculas de alto valor comercial, es necesario estudiar su capacidad de producción de carotenoides a diferentes escalas de cultivo.

## 1.2. *Scenedesmus*

Habiendo establecido la importancia de las microalgas en general y de la cepa *Scenedesmus incrassatulus* en particular, es conveniente hacer una breve descripción de esta microalga.

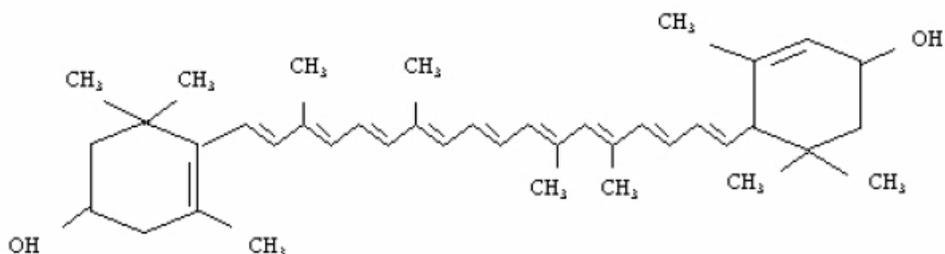
*Scenedesmus incrassatulus* es una microalga que pertenece a la clase *Chlorophyceae*, orden *Chlorococcales*, familia *Scenedesmeaceae*. El género se subdivide a su vez en *Scenedesmus* y *Desmodesmus*, las células de ambos géneros se caracterizan por ser alargadas y agruparse en cenobios planos de 2 a 32 células (Vanormelingen *et al.*, 2007).

Las especies del género *Scenedesmus* son organismos ubicuos que se encuentran en cuerpos de agua dulce, frecuentemente son las especies dominantes de lagos y ríos, aunque también las hay de agua salada. Del género *Scenedesmus* se han logrado identificar alrededor de 200 especies diferentes (Kim *et al.*, 2007).

Entre las aplicaciones que se han encontrado para las especies de *Scenedesmus* se encuentran el tratamiento de aguas, remoción de metales pesados y exceso nutrientes como nitratos y fosfatos (Çelekli *et al.*, 2008) y la producción de carotenoides, principalmente luteína (Sánchez *et al.*, 2008a,b; García-Cañedo, 2009).

## 1.3. Luteína

La luteína es una xantofila, es decir, un carotenoide que posee oxígeno en su molécula, de fórmula  $C_{40}H_{56}O_2$  (Rodríguez-Amaya, 2001) (Fig. 2). El nombre de la luteína proviene del latín *luteum* (huevo) o *luteus* (amarillo), y es un pigmento amarillo–naranja de la familia de los carotenoides que está presente en la yema de huevo, flores de caléndula, maíz y en los vegetales de hoja verde.



**Figura 2.** Estructura de la luteína (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

Los carotenos se dividen en dos grupos: carotenoides que contienen únicamente carbono e hidrógeno en su molécula, y xantofilas las cuales contienen oxígeno además de los dos elementos anteriores mencionados. Los carotenoides primarios se localizan dentro de la membrana tilacoidal sin exponerse al medio acuoso, mientras que las xantofilas se encuentran en la misma membrana con los grupos polares expuestos a la parte acuosa o en vesículas lipídicas, ya sea en el estroma o en el citosol (Eonseon *et al.*, 2003; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003), este último es el caso de la luteína.

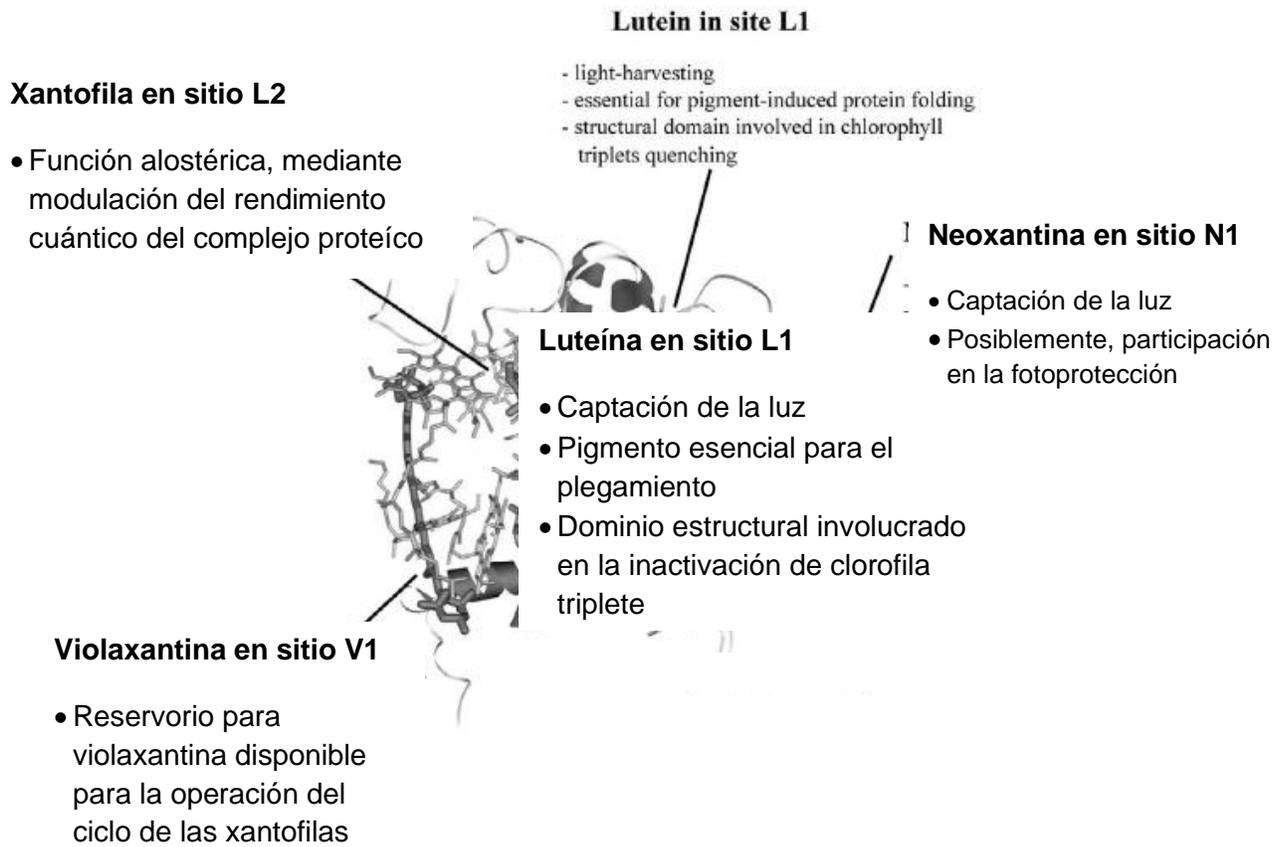
### **1.3.1. Luteína y su función en sistemas fotosintéticos**

La luteína es considerada un carotenoide primario, ya que es parte estructural de la antena captadora de luz (LHC, por sus siglas en inglés) y es requerida para el óptimo funcionamiento de la misma y los fotosistemas (Liu *et al.*, 2004), por lo que la producción de la luteína está asociada al crecimiento.

Algunos carotenoides tienen una gran capacidad antioxidante, y puede deducirse que presentan actividad antioxidante contra radicales generados dentro de la membrana tilacoidal. Por otro lado, las xantofilas, con grupos polares expuestos al medio acuoso de la célula, pueden reaccionar con los radicales libres de la zona acuosa (por ejemplo zeaxantina y luteína) (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

La composición de los aparatos fotosintéticos de plantas y microalgas clorófitas está extremadamente conservada, los centros de reacción contienen carotenoides, clorofila *a* y proteínas. Mientras que la LHC contiene clorofila *a*, *b* y xantofilas. La LHC requiere de xantofilas como luteína, neoxantina y violaxantina para su funcionamiento óptimo (ver Fig. 3) (Liu *et al.*, 2004). Sin embargo, la razón de la existencia de diversos tipos de carotenoides y xantofilas todavía no está del todo clara. Lo anterior sugiere que los carotenoides y xantofilas tienen un papel específico. Los carotenos realizan cuatro funciones en la fotosíntesis: 1) inactivación de clorofila en estado triplete activado, 2) inactivación de oxígeno singulete, 3)

inactivación de clorofila en estado singulete y 4) sensibilización de la clorofila en estado singulete (Mimuro y Akimoto, 2003).



**Figura 3.** Estructura de la antena fotorreceptora y funciones de las xantofilas en plantas superiores (Liu *et al.*, 2004).

Debido a que durante la fotosíntesis se crean especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), los carotenoides y xantofilas cumplen la función de inactivarlos, antes de que dañen a la clorofila y los complejos proteicos que forman las LHC y los centros de reacción (RC, por sus siglas en inglés). De hecho, todos los carotenoides y xantofilas poseen características de absorción de luz similares, y son capaces de inactivar tripletes de clorofila y especies reactivas de oxígeno (ROS) dañinas, producidas durante la fotosíntesis oxigénica (Dall'Osto *et al.*, 2006). Se asume que contribuyen también a aumentar la eficiencia de captación de luz y la disipación de excesos de energía lumínica (Barsanti y Paolo, 2014).

La inactivación de ROS, es una función importante de los carotenoides, ya que los radicales libres atacan a los ácidos grasos insaturados de las membranas, iniciando una serie de reacciones en cadena que conducen a la peroxidación (degradación) de los lípidos de las membranas celulares, lo que puede conducir en última instancia a la lisis celular. Se cree que la presencia de ROS activa los genes encargados de la síntesis de enzimas que catalizan la obtención de luteína y otros carotenoides (Apel y Hirt, 2004). Los ROS pueden generar daños funcionales y estructurales a las células, inactivando enzimas y dañando el ADN. Para hacer frente a esta situación las células fotosintéticas poseen un sistema biológico de defensa que incluye antioxidantes como los carotenoides y xantofilas, y las enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Asada, 2006). La función protectora es general de los carotenoides y no es específica de la fotosíntesis (Mimuro y Akimoto, 2003). Los carotenoides ayudan en otros organismos a inactivar radicales libres actuando como antioxidantes y mejorando la salud de diversos organismos.

### **1.3.2. Aplicaciones de la luteína en la salud humana y en la industria de alimentos**

La luteína se usa comúnmente como aditivo alimentario en acuicultura y en la industria avícola, pero también es usada como un ingrediente funcional o colorante natural de productos farmacéuticos, cosméticos y de alimentos (Cordero *et al.*, 2011).

Todos los carotenoides son compuestos muy importantes para la salud humana (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). En el hombre y los animales, los carotenoides y las xantofilas tienen diversas funciones, como por ejemplo la de estimular el sistema inmunológico. En particular la luteína y zeaxantina funcionan en la protección y prevención contra enfermedades de la piel y los ojos (Krinsky *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2009). La luteína ayuda a prevenir o aminorar los efectos de diversas enfermedades degenerativas en humanos, tales como enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo y la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés) (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010).

La luteína es particularmente importante para la salud de la visión, previniendo enfermedades como la AMD, cataratas, y en la piel previniendo el daño ocasionado por la luz ultravioleta (Chasan-Taber *et al.*, 1999; Gale *et al.*, 2001; Snellen *et al.*, 2002; Brandon, 2008). El consumo de 6 a 14 mg de luteína por día ha sido asociado con la reducción del riesgo de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en un 50% y con la reducción del riesgo de padecer cataratas en un 20% (Gale *et al.*, 2001; Snellen *et al.*, 2002; Bone *et al.*, 2003; Carpentier *et al.*, 2009), padecimientos que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) son los principales causantes de ceguera, y van en aumento (WHO, 2004).

Sin embargo, la luteína no es sintetizada en el organismo humano, por lo que debe ser obtenida de los alimentos o suplementos vitamínicos (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Por lo anterior, es necesario buscar fuentes de luteína de bajo costo con el objetivo de disminuir el costo en salud asociado a algunas enfermedades de la vista y de la piel.

El mercado global de luteína ha crecido significativamente en años recientes, diversos reportes indican que solamente en los Estados Unidos de América las ventas de este colorante ascienden a cerca de \$150 millones de dólares al año (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2013).

La fuente comercial de luteína es la flor de cempasuchitl (*Tagetes erecta*), pero su bajo contenido de luteína de solamente 0.03% al considerar la planta completa ha hecho considerar fuentes alternativas para la producción de luteína, como las microalgas. Existen reportes de diversas especies de microalgas, como por ejemplo *Muriellopsis* sp. (Del Campo *et al.*, 2001), *Chlorella zofingiensis* (Del Campo *et al.*, 2004), *Chlorella sorokiniana* (Cordero *et al.*, 2011), *Scenedesmus obliquus* (Chan *et al.*, 2012) y *Scenedesmus almeriensis* (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010), en los que se indica que éstas producen luteína con productividades más altas y con contenidos superiores a los reportados para la flor de cempasuchitl, y por lo tanto son consideradas como alternativas comerciales prometedoras. La microalga *Scenedesmus incrassatulus* ha sido identificada como una posible fuente

de luteína (García-Cañedo, 2009; García-Cañedo *et al.*, 2011), el cual es un cetocarotenoide de gran importancia en la industria avícola y necesaria para la salud visual y de la piel del ser humano (Carpentier *et al.*, 2009), por lo que se vislumbra como una gran alternativa para la producción de luteína a gran escala.

Una estrategia ampliamente usada en la producción de luteína y/o carotenoides a partir de microalgas es la manipulación de las condiciones de cultivo, más específicamente la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (Lababpour *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2013; Dineshkumar *et al.*, 2015).

#### **1.4. Carotenoides, nutrientes y cultivo por lote alimentado**

##### **1.4.1. Nutrientes y lote alimentado**

La concentración y perfil de carotenoides de microalgas se encuentra relacionada con la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo, y más específicamente con la concentración de nitrógeno (N) en el medio (Lababpour *et al.*, 2005; García-Cañedo, 2009). El suministro de nutrientes es un factor de especial interés debido a que es un requisito para obtener altas productividades; sin embargo, el intervalo de concentraciones para macronutrientes es amplio y para micronutrientes es algo más estrecho (Grobbelaar, 2010). Pero debido a que el N no es consumido de manera independiente a otros nutrientes es conveniente hacer una breve mención de los nutrientes que son requeridos por las microalgas.

Los requerimientos mínimos para la composición de medios de cultivo surgen de balances de masa elementales, por ejemplo de nitrógeno y fosfato, los cuales son los principales nutrientes del medio (Morweiser *et al.*, 2010). Vonshak (1986) enlistó que los requerimientos para el desarrollo de medios de cultivo deben considerarse de la siguiente forma:

- El contenido de sal total está determinado por el hábitat de donde se ha aislado la microalga.
- Se debe considerar la composición de los componentes iónicos mayoritarios.
- Las fuentes de nitrógeno son principalmente nitrato, amonio y urea.

- La fuente de carbono puede ser CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> o carbono orgánico como acetato o glucosa.
- pH, generalmente básico.
- Elementos traza y compuestos quelantes.
- Los requerimientos de vitaminas, se consideran al final.

Los nutrientes del medio de cultivo pueden manipularse para obtener una respuesta de las microalgas, por ejemplo, la aplicación de un estrés o estímulo nutricional puede ser una estrategia para la producción de compuestos específicos, como son carotenoides y ácidos grasos, que se producen cuando hay deficiencia de nitrógeno (Lababpour *et al.*, 2005; Stephenson *et al.*, 2010), ya que en estas condiciones la formación de proteínas y ácidos nucleicos se inhibe, lo que dirige el metabolismo de algunas cepas de microalgas a almacenar el CO<sub>2</sub> fijado.

La productividad de las microalgas puede depender de nutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio, hierro, manganeso, debido a que estos son necesarios para el proceso de fotosíntesis. El nitrógeno se encuentra presente en forma de proteínas que forman parte de los complejos antena (LHC), los centros de reacción y las enzimas que participan en la fotosíntesis. El fósforo se requiere como fosfato para almacenar la energía lumínica capturada en forma de energía química como moléculas nicotinamida adenin dinucleotido fosfato reducido (NADPH) y adenosin trifosfato (ATP). El magnesio se encuentra en el anillo porfirínico de la clorofila, el hierro forma parte de la ferredoxina, que es un transportador de electrones del fotosistema I (PSI). El manganeso es importante, ya que actúa como cofactor en el complejo liberador de oxígeno, el cual libera los electrones que serán transportados por los fotosistemas para almacenar energía en forma de ATP (González-Moreno *et al.*, 2008; Dau y Zaharieva, 2009; Magnuson *et al.*, 2009).

Las microalgas clorofíceas, como es el caso de *Scenedemus incrassatulus*, al ser organismos fotosintéticos similares a las plantas superiores tienen requerimientos nutricionales parecidos. Por lo tanto, los requerimientos nutricionales de las plantas superiores pueden utilizarse como base para las

microalgas, ya que el desarrollo del conocimiento de las mismas se ha llevado a cabo durante un mayor periodo de tiempo. Por ejemplo, en 1890 diversos científicos ya habían establecido que el carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), y hierro (Fe) eran requeridos por las plantas, y entre 1922 y 1954 se determinó que existían elementos esenciales adicionales, los cuales son manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo), boro (B) y cloro (Cl). Los requerimientos de estos nutrientes varían enormemente (el rango relativo es de 1 a 1 millón). Por lo tanto, no es de sorprender que muchos de los elementos esenciales no fueran descubiertos hasta que se logró la purificación de reactivos y que los límites de detección de los procedimientos analíticos fueron disminuidos por debajo de 1 mg (Jones, 1998).

Después de la luz y el CO<sub>2</sub>, el siguiente nutriente en base a la cantidad requerida por las microalgas es el nitrógeno. El nitrógeno puede encontrarse en la biomasa de las microalgas tanto en forma orgánica como inorgánica. Puede combinarse con C, H, O, y algunas veces con S para formar aminoácidos, proteínas y enzimas, ácidos nucleicos, clorofila y alcaloides (Jones, 1998).

Otro elemento que también es requerido por las microalgas es el fósforo (P). El fósforo es un elemento de gran importancia en los sistemas biológicos, ya que es un componente de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), del ATP (adenosin trifosfato), y se encuentra enlazado reversiblemente a algunas moléculas de proteínas y azúcares para su señalización (Jones, 1998).

Entender el consumo de nutrientes y los factores que promueven el crecimiento de la biomasa es muy importante para diversas aplicaciones de las microalgas, como la producción de biomasa o para la síntesis de productos de interés como lo son los carotenoides, y también para la operación de fotobioreactores que puedan tener altas productividades y rendimientos (García-Cañedo, 2009; Wu *et al.*, 2013).

El N y el P se consumen en cierta relación N:P, la cual se conoce como relación Redfield, en honor a Alfred Redfield. Normalmente se asume que el N está limitado a N:P<16 y que el P está limitado a N:P>16. También, se considera una

relación N:P crítica donde ambos nutrientes son limitantes del crecimiento al mismo tiempo (Geider y La Roche, 2002). La relación N:P intracelular crítica no es una constante biológica y puede estar regulada por las condiciones ambientales como la irradiación de luz debido a que los complejos captadores de luz y los componentes de la cadena transportadora de electrones representan una fracción considerable, pero variable, de la masa celular (Geider *et al.*, 1996). Por lo que la variabilidad de la composición N/P de microalgas puede presentarse debido a cambios en la concentración de macromoléculas que contienen N y P, o por la acumulación como reserva de nutrientes (nitrato y fosfato) o energía.

Todos los organismos tienen requerimientos nutricionales mínimos, óptimos y máximos, y la concentración de nutrientes en el medio afecta la tasa de crecimiento (Grobbelaar, 2010). Los medios de cultivo de uso común a nivel de laboratorio generalmente no resultan adecuados para alcanzar altas concentraciones de biomasa, debido a que concentraciones elevadas de sales hacen que pueda presentarse su precipitación o una inhibición del crecimiento (Morweiser *et al.*, 2010). También debe considerarse el hecho de que algunas microalgas tienen la capacidad de consumir nutrientes de manera excesiva y almacenarlos, un fenómeno conocido como “luxury uptake” (Grobbelaar, 2010), este consumo se presenta cuando las células han sido expuestas a un medio con poca o casi nula concentración de ciertos nutrientes (“starvation”) o bien cuando las células tienen la capacidad de acumular nutrientes, y en este caso no se requiere una privación de nutrientes previa (Eixler *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2009). Es importante señalar que el consumo excesivo de nutrientes es deseable en una cepa de microalga destinada al tratamiento de aguas residuales, ya que permitiría la remoción de nutrientes o contaminantes sin la generación de biomasa como producto secundario. Sin embargo, para la producción de metabolitos es más conveniente que no haya acumulación de nutrientes lo que aumenta los rendimientos de biomasa y/o productos.

Generalmente se piensa que mientras más nutrientes haya en un ambiente acuático más crecen y se desarrollan los organismos de ese sistema. Sin embargo, la abundancia de nutrientes no siempre es benéfica. Por ejemplo, el crecimiento de

las microalgas puede inhibirse por exceso de ciertos nutrientes como nitrógeno en el medio (Lababpour *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007). Además se ha reportado que la asimilación de nitrato y fosfato por microalgas es más eficiente cuando su concentración en el medio es baja (Lodi *et al.*, 2003).

Los inconvenientes como la inhibición por exceso de nutrientes o la asimilación poco eficiente de los mismos, puede evitarse utilizando cultivo por lote alimentado, ya que este modo de cultivo permite mantener la concentración de nutrientes en intervalos que favorezcan el crecimiento (Lababpour *et al.*, 2005), la productividad, y que a la vez sean tolerables por las microalgas. Sin embargo, se han publicado pocos datos al respecto (Lababpour *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2010) o la mayoría están enfocados a la alimentación de una fuente de carbono orgánica (Wu y Shi, 2007; Shen *et al.*, 2010), no obstante, aún no es posible cultivar heterotróficamente todas las especies de microalgas y la composición química de las mismas a menudo cambia bajo condiciones de cultivo heterotrófico (Borowitzka, 1997).

Entender el consumo de nutrientes y el desarrollar biorreactores adecuados es necesario para el éxito del cultivo por lote alimentado a gran escala. Asimismo, se deben desarrollar métodos de monitoreo de nutrientes y del cultivo que sean rápidos, poco costosos y sensibles. Uno de los posibles métodos que puede usarse para este fin es la medición de la fluorescencia de la clorofila *a*.

#### **1.4.2. Fluorescencia de la clorofila *a*, herramienta que ayuda a monitorear el aprovechamiento de luz y nutrientes**

La medición de fluorescencia de la clorofila *a* es una herramienta comúnmente usada para evaluar la actividad fotoquímica de las plantas (Salomon *et al.* 2013). En particular, el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) ha sido usado para determinar los efectos de la limitación de nutrientes en algas (Qi *et al.* 2013). Asimismo, se ha reportado que el decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ, non-photochemical quenching en inglés) es el parámetro de fluorescencia más sensible que puede servir como un indicador de la acumulación de carotenoides (Pirastru *et al.*, 2012).

Actualmente la cuantificación de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* y una serie de parámetros derivados de su medición se utilizan para evaluar la cantidad de energía que es usada y disipada en el fotosistema II (PSII) (Baker, 2008). Usando la medición de la fluorescencia en cultivos de microalgas se puede monitorear la biomasa, el estado del PSII y el transporte electrónico de microalgas. Además, se puede determinar el tamaño relativo del complejo antena captadora de luz del fotosistema II (LHCII), muy importante debido a que en los complejos antena es donde se encuentran los carotenoides como la luteína.

Las mediciones de la fluorescencia de la clorofila *a* son rápidas, permitiendo tiempos de respuesta y control de segundos o minutos. Brindan un indicativo del grado de estrés al que está sometido el cultivo de algas, de manera que pueden proveerse nutrientes o tomarse rápidamente acciones correctivas en el cultivo (Grobbelaar, 2000). Esto es particularmente importante en el diseño de fotobiorreactores y en el control de su operación. Para aplicaciones específicas como la producción de pigmentos carotenoides, por ejemplo luteína, puede ser necesario aplicar cierto grado de estrés al cultivo para que se produzca el compuesto de interés. La eficiencia fotosintética y el decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ) pueden ser un indicativo del nivel de estrés presente en el cultivo (Grobbelaar, 2000), por lo tanto nos permiten cuantificar si el nivel de estrés es el adecuado para el objetivo que se busca. Se asume que las xantofilas se encuentran relacionadas directa o indirectamente con el NPQ del exceso de energía luminosa en la antena del PSII y que ayudan a disipar el exceso de energía como calor por medio del ciclo de las xantofilas o el ciclo de epóxido de luteína (Esteban y García-Plazaola, 2014).

### **1.5. Cultivo de microalgas, captación de luz y su relación con los parámetros de fluorescencia**

El crecimiento o la producción de compuestos por medio del cultivo autotrófico de microalgas depende del proceso de fotosíntesis, el cual involucra la absorción y aprovechamiento de la energía electromagnética luminosa por los fotosistemas I y II (PSI y PSII), y su transformación en energía química (NADPH y

ATP) que posteriormente es utilizada en el proceso de fijación de CO<sub>2</sub> (Perales *et al.*, 2007). Idealmente, toda la luz disponible del entorno debería ser usada para la producción de biomasa (Zijffers *et al.*, 2008) o productos. Pero en condiciones normales no sucede esto, ya que los sistemas fotosintéticos pueden estar expuestos a cantidades de luz saturantes es decir, se recibe una cantidad de energía luminosa mayor a la que puede ser transformada en energía química o la cantidad no es la adecuada (Dau y Zaharieva, 2009).

La energía luminosa es esencial para el crecimiento fotoautotrófico de microalgas. El estudio de la captación y aprovechamiento de la luz es muy importante para aplicaciones industriales. La exposición de las células de microalgas a una cantidad excesiva de luz conduce a menudo a una fotoinhibición y una disminución de la tasa de crecimiento, lo cual es más probable que se presente durante las etapas tempranas del cultivo cuando la concentración celular es baja. Al contrario, el efecto de autosombreado puede presentarse a altas concentraciones celulares y causa un decremento en la productividad debido a la limitación de luz (Choi *et al.*, 2003), inclusive cuando la cantidad de energía luminosa en el exterior es suficiente para la población dentro del fotobiorreactor (Kim y Lee, 2001). La calidad de luz, es decir la longitud de onda y/o espectro de emisión que puede ser aprovechada en el proceso de fotosíntesis, también afecta el desempeño de los cultivos de microalgas (Lee y Palsson, 1996; Park y Lee, 2001).

Es por esto que determinar la eficiencia fotosintética máxima y los límites superiores de productividad de biomasa por medio del proceso de fotosíntesis han sido un tema central en el estudio del cultivo masivo de microalgas, desde su inicio (Wassink *et al.*, 1953).

El proceso de fotosíntesis depende de los carotenoides, los cuales tienen la función de aumentar la eficiencia fotosintética y ayudar a la disipación del exceso de energía lumínica. Pero aún no se han realizado estudios que establezcan la relación entre la cantidad de nitrógeno en el medio y su efecto sobre la eficiencia fotosintética y el NPQ, en diferentes modos de cultivo. Es por lo anterior que en el presente estudio se planteó evaluar dos tipos de eficiencia fotosintética: 1) la

eficiencia fotosintética máxima de los organismos adaptados a la oscuridad ( $F_v/F_m$ ), conocida también como la máxima eficiencia cuántica del proceso fotoquímico en el PSII, ésta se determina cuando los organismos han sido adaptados a un estado de oscuridad,  $Q_A$  se encuentra completamente oxidada y todos los centros de reacción se encuentran abiertos; y 2) la eficiencia fotosintética operacional de los organismos adaptados a una cantidad de luz actínica ( $F_q'/F_m'$ ), representa un estimado de la eficiencia a la cual la luz absorbida por el PSII es usada para la reducción de  $Q_A$ , a una densidad de flujo fotónico (PFD) dada.

Por otra parte, la energía disipada puede ser cuantificada como fluorescencia o como el decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ), cuya magnitud brinda un indicativo de la cantidad de energía disipada como calor (Baker, 2008; Henriques, 2009).

Este tipo de estudios pueden servir de base para el diseño y operación de cultivos masivos de microalgas a escalas industriales, que permitan obtener grandes productividades y altos rendimientos de biomasa y/o productos.

## **1.6. Producción industrial de microalgas y escalamiento para la producción de luteína**

El éxito de la producción comercial de microalgas a gran escala depende de muchos factores, entre los cuales podemos mencionar el desarrollo de sistemas de cultivo a gran escala económicamente viables, este desarrollo ha sido y continúa siendo un proceso gradual (Borowitzka, 1999).

En la década de los 50's, debido a los avances en la microscopía y a la relativamente reciente producción de microorganismos en biorreactores, se postuló por primera vez el empleo de la luz solar y agua marina, para obtener cultivos masivos de microalgas ricas en proteína de alta calidad (Tabla 1), como una buena alternativa para obtener alimento para el ser humano (Contreras-Flores *et al.*, 2003).

Durante los años 60's y 70's, diversos grupos de investigación tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo, dedicaron esfuerzos a intentar lograr rendimientos de biomasa que pudieran equipararse a los obtenidos con

microorganismos no autótrofos (principalmente levaduras) (Contreras-Flores *et al.*, 2003).

**Tabla 1.** Comparación de la composición general de algunas fuentes de alimentos humanos y algas (% de materia seca).

Producto	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
Levadura de panadería	39	38	1
Carne	43	1	34
Leche	26	38	28
Arroz	8	77	2
Frijol de soya	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<b><i>Scenedesmus obliquus</i></b>	<b>50-56</b>	<b>10-17</b>	<b>12-14</b>
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Los datos presentados son estimaciones, dado que la proporción de los constituyentes de los cultivos y células dependen de parámetros ambientales. (Spolaore *et al.*, 2006).

La producción a gran escala de microalgas empezó en los años 60's en Japón, con el cultivo de *Chlorella* por la compañía Nihon Chlorella. Fue seguido, en los 70's por el establecimiento de una instalación para producir y cosechar *Arthrospira (Spirulina)* en el Lago de Texcoco por Sosa Texcoco S. A., en la Ciudad de México. Para la década de 1980, existían más de 46 instalaciones en Asia produciendo más de 1,000 Kg mes<sup>-1</sup> de microalgas (principalmente *Chlorella*). En aproximadamente 30 años, la industria biotecnológica de microalgas ha crecido y se ha diversificado de manera significativa. Actualmente se producen aproximadamente 5,000 Ton de peso seco de microalgas año<sup>-1</sup> con un valor aproximado de 1.25 x 10<sup>9</sup> dólares americanos año<sup>-1</sup>, sin incluir productos procesados (Spolaore *et al.*, 2006).

El inicio del cultivo de microalgas puede considerarse el inicio de una nueva agricultura: la microagricultura. La agricultura de plantas superiores lleva un desarrollo acumulado de miles de años, pero se encuentra limitada por la cantidad de tierra que se puede dedicar para este uso, además de que la agricultura convencional provoca la pérdida de suelo por erosión (Brown, 2009). Debido a que las microalgas pueden cultivarse en espacios más pequeños y a que su tiempo de desarrollo es menor, su potencial es tan grande o mayor que el de la agricultura de plantas superiores (Tabla 1).

Debido a su composición química (Tabla 1), las microalgas se han utilizado en la nutrición humana y animal. Pero también resultan de utilidad para la producción de moléculas puras de alto valor comercial en concentraciones lo suficientemente altas para su producción industrial. Este tipo de moléculas pueden ser ácidos grasos, pigmentos, ficobiliproteínas, vitaminas, etc. (Contreras-Flores *et al.*, 2003; Spolaore *et al.*, 2006).

Sin embargo, la aplicación comercial de microalgas es todavía limitada. Una de las razones fundamentales para ello es la baja tasa de crecimiento debido al uso de luz intensa, causante de fotoinhibición de los cultivos. Además, la mayoría de los productos microalgales se producen cuando el cultivo se encuentra en condiciones de limitación de nutrientes o bajo condiciones de estrés (Hejazi y Wijffels, 2004). Para aumentar los rendimientos y productividades se han diseñado sistemas de cultivos denominados fotobiorreactores.

#### **1.6.1. Producción de microalgas a gran escala en fotobiorreactores**

Diferentes sistemas se han diseñado y desarrollado para el crecimiento y manejo de cultivos de microalgas a gran escala (Richmond, 2004; Tredici, 2004). Existen dos tipos principales de sistemas de cultivo: sistemas abiertos y sistemas cerrados. Los sistemas abiertos de laguna son generalmente de 2-10 m de ancho y de 15-30 cm de profundidad, cada unidad cubre desde varios cientos hasta miles de metros cuadrados. El cultivo se mueve con la ayuda de paletas impulsoras a una tasa de 0.2-0.5 m s<sup>-1</sup>. Los sistemas abiertos sólo se pueden usar en cepas que

puedan soportar las condiciones cambiantes del ambiente y que puedan competir con otros microorganismos que pudieran contaminar el cultivo.

Los sistemas cerrados, más recientes y tecnológicamente avanzados, proveen la capacidad de cultivar virtualmente cualquier cepa de microalgas, protegiendo al cultivo de la invasión de contaminantes y permitiendo el control de las condiciones de operación del sistema. Estos sistemas ofrecen más altas productividades y una mejor calidad de la biomasa generada (o producto), aunque son más costosos de construir y operar que los sistemas abiertos (Del Campo *et al.*, 2007).

El diseño de fotobiorreactores es un rubro muy importante que incide en el desempeño y productividad de carotenoides de cultivos de microalgas en emplazamientos a la intemperie. El diseño y metodologías de escalamiento todavía deben ser mejoradas para proveer una cantidad adecuada de luz, maximizar la captación de dióxido de carbono, brindar un eficiente mezclado y ayudar en la remoción del oxígeno generado fotosintéticamente. Las principales variables de diseño en fotobiorreactores han sido enumeradas por Grobbelaar (2000) y son:

1. Longitud de paso de luz. Cualquier longitud que exceda los 100 mm de medio absorberá progresivamente la luz incidente.
2. Turbulencia. Mediante la cual se logra el mezclado del cultivo para evitar la formación de gradientes de nutrientes, CO<sub>2</sub> y acumulación de oxígeno.
3. Contenido de nutrientes. Este incluye el contenido y alimentación de nutrientes, incluyendo luz y CO<sub>2</sub> como nutriente gaseoso.
4. Modo de cultivo. Por ejemplo puede ser lote, continuo, semicontinuo, multietapas y lote alimentado, por mencionar algunos modos de cultivo.
5. La concentración de biomasa. Considerando que a cierta concentración de biomasa la cantidad de luz que incide al cultivo se utiliza de manera más eficiente.

6. Estado del sistema fotosintético. Recientemente se ha propuesto incrementar la eficiencia fotosintética empleando diferentes modos de cultivo, diseño de fotobiorreactores y controlando la densidad celular dentro del fotobiorreactor.

Los anteriores factores merecen gran atención al desarrollar reactores eficientes de escala industrial y de bajo costo. Es obvio que aún se requiere mucho esfuerzo para el desarrollo y escalamiento antes de que un nuevo proceso pueda alcanzar la escala de planta piloto en exteriores. Algunos autores han explorado el uso de cultivo heterotrófico para evitar los cuellos de botella del cultivo fotoautotrófico, pero en este contexto, algunas de las cepas que producen compuestos de interés son fotótrofos estrictos, además que en la producción de carotenoides la luz puede inducir la carotenogénesis (Del Campo *et al.*, 2007).

A pesar de los grandes avances que se han logrado en la construcción y operación de fotobiorreactores, esta tecnología todavía se encuentra en desarrollo. Cerca del 90% de la biomasa de microalgas producida a nivel mundial se produce en sistemas abiertos, a pesar de las ventajas que ofrecen los sistemas cerrados y su potencial en términos de productividad, control de las condiciones de cultivo y su factibilidad de uso en diferentes cepas (Provust *et al.*, 2015).

El desarrollo de fotobiorreactores y estudio de diferentes modos de operación (lote, lote alimentado y continuo) son aspectos importantes que también deben tomarse en cuenta para eficientar el cultivo masivo de microalgas. Por otra parte, el diseño, construcción y modo de operación de cualquier fotobiorreactor debe depender del tipo de cepa, el producto objetivo, localización geográfica, así como del costo total de producción (Ugwu *et al.*, 2008). Para lograr un potencial de los organismos fotosintéticos que sea económicamente viable y similar al de microorganismos eucarióticos heterotróficos, como levaduras u hongos, se requiere identificar los “cuellos de botella” del bioproceso. El principal objetivo en el cultivo de microalgas en escala industrial es disminuir los costos de los fotobiorreactores sin afectar su desempeño (Provust *et al.*, 2016).

### 1.6.2. Escalamiento de sistemas para la producción de luteína a partir de microalgas

Recientemente se ha investigado la capacidad de producción de luteína por diferentes cepas de microalgas, probándose el potencial de producción de las especies *Muriellopsis* sp. (Del Campo *et al.*, 2001), *Chlorella protothecoides* (Shi *et al.*, 2006), *Chlorella ziofingensis* (Del Campo *et al.*, 2004), *Scenedesmus almerienses* (Sánchez *et al.*, 2008b) y *Scenedesmus incrassatulus* (García-Cañedo, 2009), que son capaces de acumular luteína como parte de su biomasa.

Existen estudios para la producción en escala planta piloto a la intemperie o en invernaderos de las cepas ricas en luteína, como por ejemplo *Muriellopsis* sp. (Del Campo *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2007) y *Scenedesmus almerienses* (Sánchez *et al.*, 2008a y b).

El rendimiento de cultivo de *Muriellopsis* en sistemas cerrados al exterior ha sido verificado en un fotobiorreactor tubular de 55 L de capacidad (2.6 cm de diámetro, tubería de 90 m de longitud en un área de 22 m<sup>2</sup>) bajo régimen continuo de cultivo (Del Campo *et al.*, 2001). La máxima productividad de luteína fue de aproximadamente 180 mg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Con el objetivo de mejorar la economía del proceso, también se ha probado el desempeño y viabilidad de cultivos abiertos de *Muriellopsis* en exteriores en estanques de 1 y 3 m<sup>2</sup> con una profundidad de 0.3 m (Blanco *et al.*, 2007), con una productividad de 75 mg luteína m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, el contenido de luteína de ambos tipos de fotobiorreactores se encontró entre 0.4 y 0.6% en base seca.

En *Scenedesmus almerienses* se ha logrado una alta productividad de luteína con un valor de 290 mg luteína m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, en un fotobiorreactor de 4000 L (de 10 cm de diámetro en un espacio de 80 m<sup>2</sup>) en invernadero, con un contenido de luteína de 0.6% en base seca.

Shi *et al.* (2006) han logrado producir biomasa rica en luteína empleando *Chlorella protothecoides* en cultivo por lote heterotrófico con glucosa (40 g L<sup>-1</sup>) como fuente de carbono. La biomasa contenía menos de 0.5% de luteína. La productividad de luteína llegó hasta un valor de 10 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> bajo condiciones

optimizadas. Este proceso espera ser escalado y un mayor desarrollo. Su principal ventaja y desventaja es el uso de carbono orgánico. Por un lado favorece la alta productividad de biomasa. Pero también hace que el cultivo pueda contaminarse por bacterias y levaduras que tienen tasas de crecimiento mayores a la de las microalgas.

El escalamiento de laboratorio a producción industrial a la intemperie puede generar diferencias que se reflejan en los productos o co-productos que son sintetizados si los métodos de cultivo no son exactamente los mismos (Hewes, 2015).

García-Cañedo (2009) ha demostrado que *Scenedesmus incrassatulus* acumula gran cantidad de luteína en su biomasa mediante el empleo de lote alimentado a escala de laboratorio. Es por esto que en el presente trabajo se propone el escalamiento de fotobiorreactor que pueda operar en modo de lote alimentado. Es importante señalar que hasta la fecha no se había diseñado un fotobiorreactor para lote alimentado para cultivo a la intemperie para la producción de luteína.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La luteína se utiliza como aditivo en alimentos, especialmente en la industria acuícola y avícola, donde ayuda a brindar el color característico amarillo-naranja. Se ha demostrado que la inclusión de luteína en la dieta de adultos de erizo de mar aumenta la producción de huevos y larvas juveniles (George *et al.*, 2001). La luteína es importante económicamente debido a que es necesaria en la industria avícola para brindar el color tanto a la piel y como a la yema del huevo, las cuales son características de calidad de estos productos avícolas. En este sentido, México es el 5º mayor productor de huevo en el mundo, después de China, EUA, India y Japón (FAO, 2007), con una producción anual de 60 mil toneladas de huevo (INEGI, 2009), de ahí la importancia en México de la producción de luteína.

Uno los carotenoides más importantes para el hombre es la luteína debido a que es un componente esencial de los pigmentos protectores presentes en la mácula lútea (o punto amarillo) en la retina del ojo (Alves-Rodrigues y Shao 2004; Whitehead *et al.*, 2006). Debido a que la luteína es importante para la salud visual en el ser humano ésta debe obtenerse a través de suplementos o de consumir alimentos. El consumo de 6 a 14 mg de luteína por día ha sido asociado con la reducción del riesgo de degeneración macular relacionada con la edad en un 50% y con la reducción del riesgo de padecer cataratas en un 20% (Gale *et al.*, 2001; Snellen *et al.*, 2002; Bone *et al.*, 2003; Carpentier *et al.*, 2009), padecimientos que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) son los principales causantes de ceguera, las cuales se encuentran en aumento (WHO, 2004).

Durante los años recientes, diversas aplicaciones de la luteína han recibido considerable atención, especialmente aquellas relacionadas con la salud humana. Ahora, con base en estudios epidemiológicos es considerada como un agente preventivo efectivo contra una variedad de afecciones humanas. Las evidencias del papel protector de la luteína para retrasar las enfermedades crónicas han ido en aumento (Mares-Perlman *et al.*, 2002; Alves-Rodrigues y Shao, 2004; Whitehead *et al.*, 2006). No sólo el desarrollo de cataratas y la degeneración macular parecen ser

retrasados por la luteína (Granado *et al.*, 2003; Krinsky *et al.*, 2003; Olmedilla *et al.*, 2003; Koh *et al.*, 2004), sino también el progreso de la aterosclerosis en su fase temprana (Dwyer *et al.*, 2001), y la estimulación de la respuesta inmune mediada tanto por células como humoral ha sido verificada en modelos animales de estudio (Kim *et al.*, 2000a,b).

Debido a que se ha demostrado que la microalga *Scenedesmus incrassatulus* acumula gran cantidad de luteína y que su producción en lote alimentado es factible a escala de laboratorio (García-Cañedo, 2009), el siguiente paso era demostrar que puede ser producida y que los rendimientos obtenidos pueden mantenerse en escalas superiores de cultivo y a la intemperie.

### **3. HIPOTESIS**

La productividad volumétrica de luteína de *Scenedesmus incrassatulus* en cultivo por lote alimentado se mantendrá constante al incrementar la escala del cultivo.

La productividad de luteína de *Scenedesmus incrassatulus* en cultivo por lote alimentado posterior a su escalamiento será superior en condiciones controladas de laboratorio que a la intemperie.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Escalar la producción de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* en cultivo por lote alimentado para la producción de luteína, manteniendo altos rendimientos de luteína.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Establecer un cultivo por lote alimentado con alimentación exponencial.
- Evaluar el efecto de la concentración de N-NO<sub>3</sub> en el medio sobre la productividad de luteína en cultivo por lote alimentado.
- Establecer un cultivo por lote alimentado con alimentación por pulsos.
- Elegir un sistema de alimentación y escalar el cultivo por lote alimentado.
- Evaluar el sistema escalado a la intemperie.
- Caracterizar la eficiencia fotosintética y el decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ) del cultivo por lote alimentado.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Microorganismo, condiciones de mantenimiento y experimentación

#### 5.1.1. Cepa y condiciones de cultivo

Se utilizó la microalga clorofícea *Scenedesmus incrassatulus*, clave CLHE-S01 de la clase *Chlorophyceae* y del orden *Chlorococcales*, donada por el laboratorio de Hidrobiología Experimental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. El cultivo fue mantenido en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL de medio mineral libre de EDTA que contenía: 250 mg/L NaNO<sub>3</sub>, 30 mg/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 40 mg/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mg/L MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 25 mg/L NaCl, 4.98 mg/L FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, elementos traza 5 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.7 µM MnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.5 µM ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.1 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.5 µM Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*7H<sub>2</sub>O y 0.0284 µM CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O (Perales, 2008). Las condiciones de incubación fueron en lote para mantenimiento y preparación del inóculo con: temperatura 25 ± 3°C, con una intensidad luminosa de 200 µmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y fotoperíodo de 14h:10 h (luz/oscuridad). El inóculo se obtuvo en cultivo por lote utilizando matraces Erlenmeyer de 1 L con un volumen de trabajo de 800 mL de medio mineral.

#### 5.1.2. Condiciones de experimentación

Los experimentos fueron realizados por duplicado utilizando un reactor tubular tipo airlift (modificado a partir de Vega *et al.*, 2005) de 2 L de volumen útil, con placa intermedia perforada y concentración inicial de 2 x 10<sup>6</sup> cél/mL, tomadas de un cultivo de 7 días. Las condiciones de cultivo en condiciones controladas de laboratorio fueron: temperatura 25 ± 3 °C, intensidad luminosa 200 µmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y fotoperíodo 14h:10h (luz/oscuridad). La irradiación de luz se aumentó a 1,000 µmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a partir del día 10 de cultivo, para evitar que el autosombreado limitara el consumo de nutrientes debido a la alta concentración células en el cultivo. A la intemperie se dejó el cultivo a las condiciones de irradiación solar y temperatura del ambiente.

Para establecer el efecto del nitrógeno (N) se empleó medio mineral libre de EDTA con tres concentraciones diferentes de este elemento en el medio de cultivo,

tanto en cultivo por lote, como en cultivo por lote alimentado. En cultivo por lote se utilizó la concentración de N del medio mineral y dos concentraciones adicionales que correspondieron aproximadamente a la mitad y el doble del medio mencionado, por lo que las concentraciones iniciales de N-NO<sub>3</sub> empleadas en cultivo por lote fueron 24, 41 y 82 mg/L, las cuales en lo sucesivo serán denominadas Lote baja, Lote media y Lote alta, respectivamente.

Para la mejor implementación del modo de cultivo por lote alimentado, se siguió una estrategia lote- lote alimentado -lote, la cual a partir de aquí será denominada cultivo por lote alimentado (LA), para simplificar su denominación y señalar que en esos tratamiento se utilizó el modo de cultivo por lote alimentado. La alimentación en escala laboratorio fue realizada de dos formas: 1) lote alimentado con alimentación exponencial, en el que se realizó una predicción del consumo futuro de nitrógeno de acuerdo a un crecimiento exponencial del cultivo. La alimentación exponencial se realizó mediante goteo durante el tiempo que se requirió para completar la cantidad de medio de alimentación que debía alimentarse y ajustando diariamente la cantidad a alimentar de manera exponencial de acuerdo con el crecimiento del cultivo. 2) Lote alimentado por pulsos, donde la cantidad de medio de alimentación se calculó en base a la cantidad de N consumida. De igual forma que en cultivo por lote en cultivo por lote alimentado se emplearon tres concentraciones de N que fueron 22, 40 y 75 mg/L, las cuales mediante la alimentación de medio se mantuvieron en el fotobiorreactor en un intervalo lo más pequeño posible durante el periodo de alimentación, estos tratamientos serán en lo sucesivo denominados como LA baja, LA media y LA alta. Estos tratamientos fueron implementados con alimentación exponencial anteriormente descrita. A los tratamientos en lote alimentado anteriormente mencionados, se les agregó el mismo volumen de medio de alimentación estéril, es decir todos los tratamientos recibieron la misma cantidad de alimentación independientemente de la concentración inicial de N empleada. La alimentación se realizó entre los días 2 al 12 de cultivo.

El medio de alimentación difería del medio mineral libre de EDTA únicamente en la concentración de nitrógeno (N) y fósforo (P), siendo la concentración del primero 10 veces superior que en el medio mineral, y el P se agregó en una relación

N/P de 8, la concentración de los demás componentes fueron las mismas a las del medio mineral para evitar que su concentración disminuyera por efecto de la alimentación.

Adicionalmente se implementó un cultivo por lote alimentado a baja concentración de N (22 mg/L), también con alimentación exponencial, al cual se le alimento la misma cantidad de masa total de N que al tratamiento LA alta, el cual será denominado en lo sucesivo como LA baja igual masa total de N a LA alta. Para la implementación de este tratamiento se requirió que la alimentación se realizara entre los días 2 al 15 de cultivo.

Posteriormente se implementó el cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio (que en lo sucesivo será referido como LA pulsos), con una concentración de N en el medio en el mismo intervalo que el que presento el tratamiento LA alta, ya que este último tratamiento fue el que presentó el mayor contenido y productividad de carotenoides totales y luteína de los anteriores tratamientos.

Debido a que no se encontró diferencia significativa en cuanto a la productividad de pigmentos entre los dos tipos de alimentación anteriores (exponencial y por pulsos), se eligió la alimentación por pulsos para realizar los experimentos en cultivo por lote alimentado en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio (LAG) y a la intemperie (LAGE y LAGEO), manteniendo una concentración de N en el medio dentro del mismo intervalo a los tratamientos en escala laboratorio en lote alimentado (LA alta y LA pulsos) que tuvieron las más altas productividades y contenidos de carotenoides totales y de luteína. La alimentación de estos tratamientos en escala piloto se realizó entre los días 2 al 12 de cultivo.

## **5.2. Procedimientos analíticos**

### **5.2.1 Peso seco**

Para determinación de peso seco se tomaron muestras de 5-10 mL de cultivo cada tercer día cuando había alimentación y cada 5 días cuando no había alimentación. Las muestras se filtraron en membranas de nitrocelulosa de 5  $\mu$ m

(Millipore®), y se dejaron secar en horno a 70 °C durante 24h hasta peso constante. El filtrado se recuperó y se almacenó en refrigeración para la determinación posterior de nitratos y fosfatos en el medio.

### **5.5.2. Conteo celular**

La biomasa se cuantificó también mediante conteo celular directo en cámara de Neubauer, contando las células en los 25 cuadros de la cuadrícula central. Posteriormente se realizó el cálculo de acuerdo a la dilución empleada.

### **5.5.3. Medición del flujo fotónico**

El flujo fotónico fue cuantificado con un radiómetro QRT1 Quantitherm PAR/ Temperature Sensor en la parte exterior de los reactores, tanto en escala laboratorio como en escala piloto, y a la intemperie.

### **5.2.4. Cuantificación de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a***

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* en el PSII fue cuantificada con la técnica de un sólo pulso de luz saturante usando el protocolo de Genty *et al.*, (1989) con dos equipos, un fluorómetro FMS2 Hansatech (fluorescence monitoring system, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) y un fluorómetro Handy PEA Hansatech (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) siguiendo las metodologías del fabricante. Todas las determinaciones fueron realizadas en fase líquida usando los viales provistos con los equipos mencionados. Cuatro muestras de cada tratamiento, dos de cada réplica, fueron colectadas, ajustadas a una absorbancia  $\leq 0.5$  a 680 nm, y las determinaciones fueron realizadas para cada muestra a temperatura controlada de 25 °C. Los viales que contenían las muestras de microalgas fueron agitadas suavemente hasta mezclado completo antes de realizar las mediciones, en todas las determinaciones. El procedimiento de medición fue el siguiente: primero las células fueron adaptadas a la oscuridad colocando las muestras en completa oscuridad durante 15 minutos, de acuerdo a lo reportado por Pirastru *et al.* (2012), y usando el fluorómetro FMS2 se midieron la  $F_0$  (emisión de fluorescencia mínima del cultivo adaptado a la oscuridad) y  $F_M$  (emisión de fluorescencia máxima del cultivo adaptado a la oscuridad). Después, brindando un segundo periodo de adaptación a la oscuridad igual al anterior se determinó el

parámetro RC/ABS (densidad de centros de reacción activos por tasa de absorción) usando el fluorómetro Handy PEA, para establecer el tamaño relativo de los Complejos Captadores de Luz (LHC por sus siglas en inglés) con respecto a los centros de reacción (Christen *et al.*, 2007). Posteriormente, las células fueron adaptadas a la luz exponiendo las muestras a las condiciones de luz empleadas en el fotobiorreactor durante 5 min; se realizaron pruebas previas para asegurar que en este tiempo se alcanzaba el estado estacionario de emisión de fluorescencia de las muestras adaptadas a la luz. Usando nuevamente el fluorómetro FMS2 se midieron la  $F_s'$  (emisión de fluorescencia mínima del cultivo adaptado a la luz) and  $F_m'$  (emisión de fluorescencia máxima del cultivo adaptado a la luz). Usando las fórmulas reportadas por Baker (2008), se calcularon los siguientes parámetros: eficiencia fotosintética máxima o adaptada a la oscuridad,  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ , eficiencia fotosintética operacional o adaptada a la luz,  $F_q'/F_m' = (F_m' - F_s')/F_m'$ , y el decaimiento no fotoquímico de la fotosíntesis,  $NPQ = (F_m/F_m') - 1$ .

#### **5.2.5. Cuantificación de nitrógeno de nitratos**

Se determinó por el método de brucina-ácido sulfámico (Greenberg *et al.*, 1992) a partir del filtrado o el sobrenadante obtenido por centrifugación de las muestras. En un tubo de ensayo se mezclaron 0.3 mL de NaCl al 30% y 0.075 mL del reactivo de brucina-ácido sulfámico. Se agregaron 1.5 mL de medio filtrado o sobrenadante de centrifugación (diluido durante los primeros días del cultivo) y 1.5 mL de solución acuosa de ácido sulfúrico 1:1.25 y se mezclaron. El tubo con la mezcla se agitó para homogeneizar la muestra y se incubó a 94°C durante 20 min, posteriormente se enfrió el tubo hasta temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 410 nm. La concentración de nitratos se calculó empleando una curva patrón de cuatro puntos de referencia elaborada a partir de una solución de  $KNO_3$  con una concentración de 1 mg/L.

#### **5.5.6. Cuantificación de fosfatos**

El contenido de fosfatos se cuantificó por el método modificado de Taussky y Shorr (González y Peñalosa, 2000). A una muestra de 1 mL de medio filtrado o sobrenadante obtenido por centrifugación se le agregó 1 mL de ácido tricloroacético

0.5 N (TCA) y 1 mL de reactivo de color, este último se preparó al momento de la determinación mezclando 4 mL de molibdato de amonio al 16% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N, 36 mL de agua destilada y 2 g de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. La solución obtenida de mezclar la muestra, el TCA y el reactivo de color se agitó y se mantuvo en la oscuridad por 10 minutos, pasados los 10 min se registró la absorbancia a 660 nm con un espectrofotómetro. La concentración de fosfatos se calculó empleando una curva patrón elaborada con una solución patrón con concentración de 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### **5.2.7. Contenido intracelular de N y P**

El contenido intracelular de nitrógeno y fósforo de las células de microalgas fue calculado mediante un balance de masa, considerando que la cantidad de nutrientes removidos del medio es totalmente incorporado a la biomasa. Por lo tanto, el contenido de nitrógeno y fósforo de las células de microalgas iguala el consumo de nitrógeno y fósforo dividido entre el incremento de peso seco de biomasa de microalgas, tal y como fue reportado por Wu *et al.* (2012 y 2013). El efecto del pH sobre la solubilidad del PO<sub>4</sub> fue descartado en los cálculos del contenido de P, debido a que la insolubilización de este compuesto solamente puede ocurrir a pH ≥ 8.5 (Díaz *et al.*, 1994) y todos los días o inclusive varias veces al día el pH fue ajustado a 7 mediante la adición de HCl, brindando la oportunidad de que el PO<sub>4</sub> estuviera disponible y fuera consumido por las células de microalgas. El contenido de nitrógeno ha sido corroborado en estudios previos usando un equipo TOC-VCSN Total Carbon Analyzer (García-Cañedo, 2009).

### **5.2.8. Cuantificación de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales**

La extracción de clorofilas a, b y carotenoides totales se realizó utilizando acetona al 100% (Lichtenthaler y Wellburn, 1983; Dunn *et al.*, 2004). El procedimiento fue el siguiente: se tomaron 2 mL de cultivo, se centrifugó y se descartó el sobrenadante, al paquete celular obtenido se le agregó 1 g de arena de mar para análisis, purificada con ácido y calcinada (Merck). Se maceraron las células con varilla de vidrio, se resuspendieron en 2 mL de acetona al 100% mediante agitación. El paquete celular resuspendido se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, al sobrenadante se le midió absorbancia a 662 nm para clorofila a,

645 nm para clorofila *b* y 470 nm para carotenoides totales. Cuando fue necesario, se repitieron los pasos anteriores, hasta que el paquete celular quedó incoloro. El cálculo de la concentración de clorofilas y carotenoides se realizó según las fórmulas propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1983).

### **5.2.9. Cuantificación e identificación de xantofilas totales por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Se utilizó el procedimiento recomendado por el laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México (Gilmore y Yamamoto, 1991). Se tomaron de 15 a 25 mL de muestra y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante, el paquete celular obtenido de esta forma fue liofilizado durante 24 horas. La pastilla liofilizada conteniendo las células fue macerada con varilla de vidrio y resuspendida en 3 mL de solución HEAT (Hexano, Etanol, Acetona y Tolueno 10:6:7:7) y se sometió a sonicación durante 3 min, con un sonicador de tipo pluma. El extracto así generado fue transferido a un matraz aforado de 10 mL. Se agregaron 0.2 mL de KOH al 40% en metanol y se incubó en baño maría a 56°C durante 20 min para llevar a cabo la saponificación de los ácidos grasos contenidos en la muestra. Se enfrió el matraz aforado conteniendo el extracto de pigmentos con los lípidos saponificados y se agregaron 3 mL de hexano, posteriormente se agitó vigorosamente. Por último, se aforó a 10 mL con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, volviendo a agitar pero esta vez suavemente. La cuantificación del extracto de xantofilas así obtenido, se realizó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 474 nm a la fase superior generada por el método de extracción, conocida como epifase.

La detección de los pigmentos por HPLC en fase inversa, se realizó en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 1100, con detector de arreglo de diodos en un rango de 360-800 nm y un registro fijo a 474 nm. Se empleó una columna Allosphere ODS-I en la que se inyectaron 20 µL de la epifase obtenida de la extracción de xantofilas totales con la solución HEAT, con un flujo de 2 mL/min durante 12 min. Para la fase móvil se emplearon dos mezclas de solventes, la fase

A: acetonitrilo/ metanol/ TRIS-HCl buffer 0.1 M pH 8.0, con la siguiente relación de solventes 75/12/4, y la fase B: Metanol/Hexano a una relación 4/1. El método de determinación consistía en dejar fluir la fase A al 100% por la columna durante 5 min, seguido de un gradiente lineal de 2.5 min en el que se combinó la fase A con la fase B, a partir de los 7.5 min y hasta los 12 min fluyó únicamente la fase B al 100%.

La identificación de los pigmentos se realizó tomando en picos de absorción máxima de cada pigmento, los cuales fueron contrastados con la literatura correspondiente. La cuantificación de luteína se realizó mediante el uso de un estándar externo de cantaxantina y luteína, marca Sigma, mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Concentración pigmento} &= \frac{mg_{\text{pigmento}}}{g_{\text{biomasa}}} \\ &= \frac{\text{Area}_{\text{pigmento desconocido}} \cdot \text{masa}_{\text{pigmento referencia}}}{\text{Area}_{\text{pigmento de referencia}} \cdot w} \end{aligned}$$

Donde w es el peso de muestra de microalgas (g)

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para mayor claridad, se presentan primeramente las condiciones que causaron la variación: concentración de nutrientes, contenido intracelular de nutrientes y condiciones ambientales de luz y temperatura a la intemperie. Posteriormente se presentan y discuten el efecto de estas condiciones sobre el crecimiento, parámetros de fluorescencia y pigmentos (clorofilas y carotenoides).

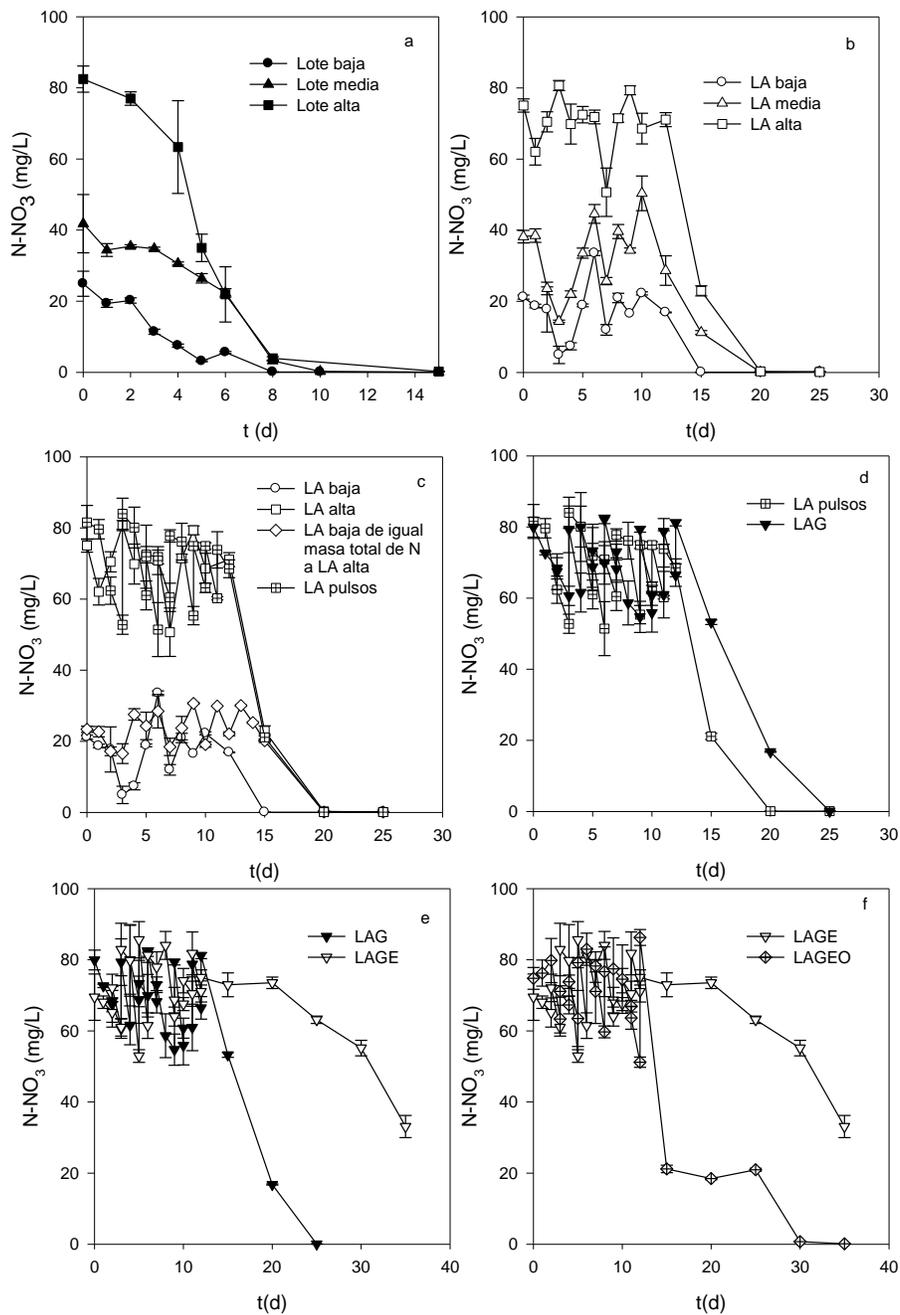
### **6.1. Concentración y consumo acumulado de nutrientes**

#### **6.1.1. Concentración de nitrógeno en el medio**

Este trabajo se ha centrado, en parte, sobre la variación de  $N-NO_3$  en el medio. Este elemento es considerado limitante del crecimiento de organismos fotosintéticos debido a su escasez en ciertos ecosistemas por lo que la evaluación del N del medio ha sido fundamental para este trabajo. En la figura 4 se muestra la concentración de N en el medio de cultivo de todos los tratamientos. En cultivo por lote, el N se había casi agotado para el día 8 de cultivo (Fig. 4a), mientras que en cultivo por lote alimentado (Fig 4b) el N se agotó entre los días 15 al 20. Esto indica que la tasa de consumo de N aumentó a medida que aumentó la concentración inicial de N.

Ubicándonos ahora en las figuras 4b y 4c, se observa que el N en el medio de cultivo se agotó el día 15 para el tratamiento LA baja, mientras que en los tratamientos LA media, LA alta, LA baja (de igual masa total de N a LA alta) y LA pulsos el N se agotó hasta el día 20 de cultivo. Es decir, que la tasa de consumo de N tuvo que presentar una variación para que el N se agotara el mismo día de cultivo debido a que se usaron diferentes concentraciones iniciales de N y diferentes concentraciones de nitrógeno mantenidas

Se implementó el tratamiento LA pulsos con una cantidad total de nitrógeno igual a LA alta (Fig. 4c) cumpliendo con el objetivo de establecer un cultivo por lote alimentado con alimentación por pulsos. También se logró implementar de manera exitosa y controlada el tratamiento LA baja con igual masa total de N a LA alta (Fig. 4c), cumpliendo con el objetivo de establecer un cultivo por lote alimentado con alimentación exponencial.



**Figura 4.** Concentración de nitrógeno (N) en el medio de cultivo, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado con el mismo volumen de alimentación; c) cultivo por lote alimentado con el mismo volumen de alimentación (LA baja y LA alta) y con la misma masa total de N alimentada (LA alta, LA baja igual masa total de N a LA alta y LA pulsos); d) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio (LA pulsos) y en escala piloto (LAG) en condiciones controladas de laboratorio; e) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio (LAG) y a la intemperie en verano (LAGE); f) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala piloto a la intemperie en verano (LAGE) y otoño (LAGEO).

Se eligió el sistema de alimentación por pulsos para escalar los sistemas, para facilitar su manejo a la escala piloto. En los tratamientos LA alta, LA pulsos, LAG, LAGE y LAGEO se mantuvo una concentración de N en el medio dentro del mismo intervalo, esto se puede observar en las figuras 4c-4f. Con esto fue posible observar el efecto del escalamiento y de las condiciones de la intemperie sobre los otros parámetros monitoreados y cumplir con el objetivo planteado de escalamiento. Para poder lograr el mismo intervalo de concentraciones de N en el medio del cultivo por lote alimentado en escala piloto a la intemperie en verano (LAGE) fue necesario no alimentar nada los días 4, 7 y 8, de igual manera en el tratamiento LAGEO (lote alimentado en escala piloto a la intemperie en otoño) fue necesario no alimentar nada los días 6, 9 y 10, debido a que la acumulación de N en el medio hubiera ocasionado que la concentración del mismo se saliera del rango de N que se pretendía mantener en el cultivo.

A diferencia de los tratamientos LA alta y LA pulsos, donde el N del medio se agotó casi en su totalidad al día 20, en los tratamientos LAG, LAGE y LAGEO, implementados en escala piloto, se observó que la concentración de nitrógeno del medio disminuyó más lentamente. En el caso del tratamiento LAG, se alcanzó la concentración mínima hasta el día 25 de cultivo, mientras que en LAGE al día 35 de cultivo el N del medio no se había agotado todavía, habiendo en el medio de cultivo una concentración de 33.1 mg N/L. Y en el caso del tratamiento del cultivo LAGEO, el N en el medio se agotó al día 30 de cultivo. Por lo tanto, en los tratamientos realizados a la intemperie en este estudio el consumo de N se vio afectado por las condiciones variables de luz y temperatura (que se muestran en la siguiente sección).

El que la concentración de nitrógeno del medio disminuyera más lentamente en los tratamiento en escala piloto puede deberse a que la iluminación dentro del fotobiorreactor en escala piloto fue inferior a la de la escala laboratorio afectando la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR), esta enzima es directamente afectada por la iluminación. Hong *et al.* (2011), encontraron que la actividad NR detectada en muestras de fitoplancton colectadas durante el día era mayor a las colectadas

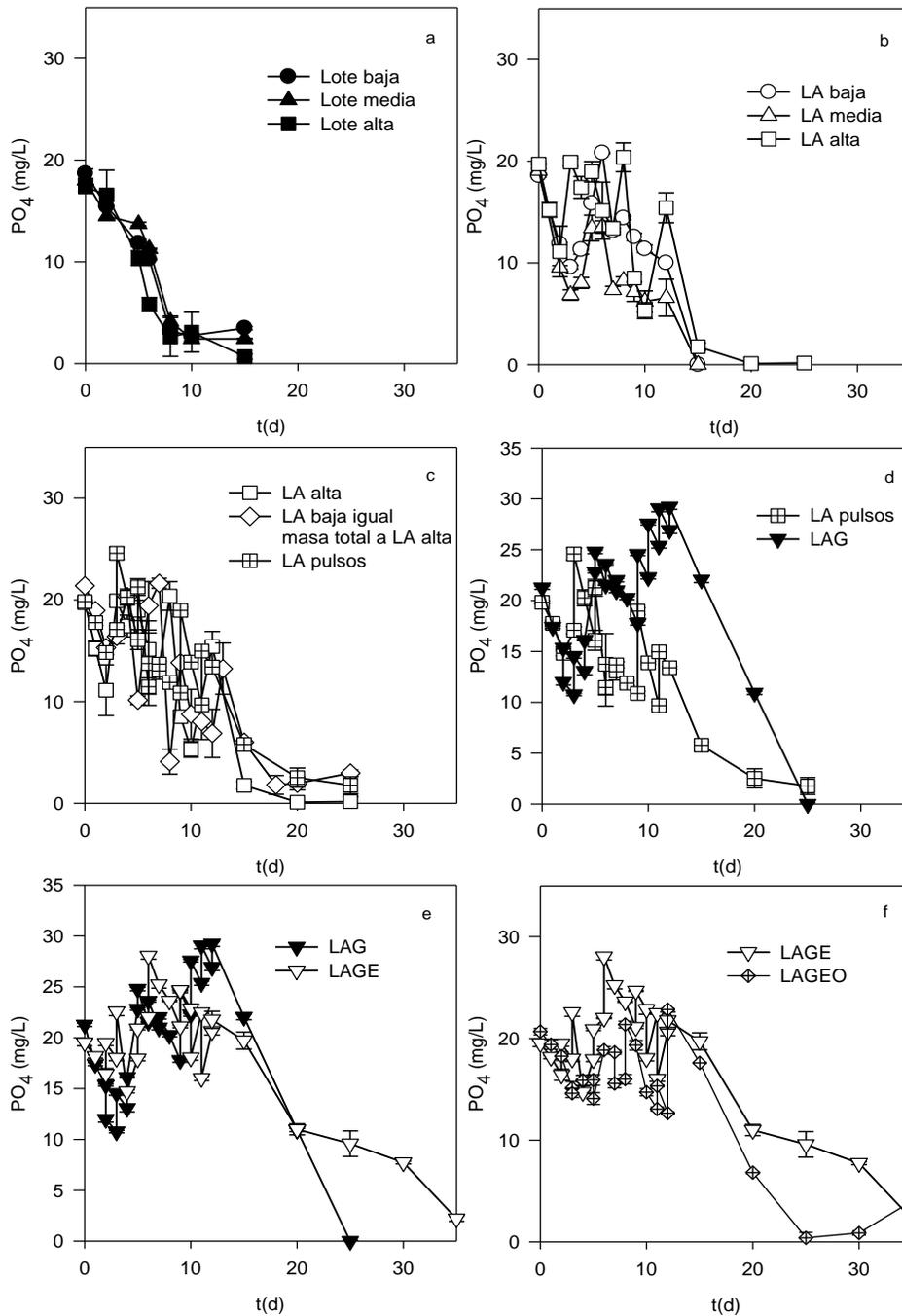
durante la noche, e infieren que la actividad de NR puede también estar regulada por las condiciones de luz.

### **6.1.2. Concentración de fosfato en el medio**

El fósforo es otro de los elementos que se requieren para el crecimiento de las microalgas (Wu *et al.*, 2012), y que generalmente se consume en cierta relación con respecto a N, por lo que ha sido importante la evaluación de su concentración en el medio de cultivo como fosfatos. En la figura 5a-f se muestra la concentración de  $PO_4$  en el medio de cultivo de todos los tratamientos. Como se puede observar en la figura 5a, la variación de concentración de fosfato en el medio de cultivo en los tratamientos Lote baja y Lote media fue muy similar, disminuyendo la concentración de fosfato de 18 a 3 mg/L desde el inicio hasta el día 8 de cultivo. En el tratamiento Lote alta, la concentración de fosfatos disminuyó de 18 a 2.6 desde el inicio al día 6 de cultivo, es decir, más rápidamente. Por lo tanto, en cultivo por lote aumentar la concentración inicial de N aumenta la velocidad de consumo de  $PO_4$ .

Los tratamientos en lote alimentado en escala laboratorio, LA baja, LA media, LA alta, LA baja (de igual masa total de N a L alta), y LA pulsos (Fig. 5b-5c), tuvieron una concentración inicial e intervalo de concentraciones de  $PO_4$  en el medio de cultivo similares. Por lo que las diferencias de crecimiento o de producción de pigmentos en estos tratamientos no pueden deberse a la variación de  $PO_4$ . En estos tratamientos, la menor concentración de  $PO_4$  en el medio de cultivo se alcanzó hasta el día 20.

En el caso de los tratamientos en escala piloto LAG y LAGEO, en condiciones de laboratorio y a la intemperie en otoño, (Fig. 5d-5f), la concentración de  $PO_4$  del medio de cultivo alcanzó su valor mínimo el día 25 de cultivo, y hubo una ligera acumulación de  $PO_4$  en LAG a partir del día 10 de cultivo. En el tratamiento LAGE (Fig. 5e), tratamiento a la intemperie en verano, la concentración de  $PO_4$  disminuyó más lentamente, después de la suspensión de la alimentación, en comparación con los tratamientos LAG, LA alta y LA pulsos, alcanzándose la concentración mínima de este compuesto al día 35 de cultivo.



**Figura 5.** Concentración de fosfato ( $PO_4$ ) en el medio de cultivo de los diferentes tratamientos. a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado con el mismo volumen de alimentación; c) cultivo por lote alimentado con el mismo volumen de alimentación (LA baja y LA alta) y con la misma masa total de N alimentada (LA alta, LA baja igual masa total de N a LA alta y LA pulsos); d) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio (LA pulsos) y en escala piloto (LAG) en condiciones controladas de laboratorio; e) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio (LAG) y a la intemperie en verano (LAGE); f) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala piloto a la intemperie en verano (LAGE) and otoño (LAGEO).

Resumiendo el comportamiento mencionado en las figuras 5b y 5c, observamos que la concentración de fosfato en el medio de cultivo en todos los tratamientos en lote alimentado fue similar, presentando una concentración inicial de aproximadamente 20 mg PO<sub>4</sub>/L, después se presenta un comportamiento oscilatorio debido a la alimentación y finalmente una concentración final ≤ 1.8 mg PO<sub>4</sub>/L. Por otra parte, en los cultivos en escala piloto hubo una acumulación de fosfatos después del día 10 del cultivo, como se observa en las figuras 5d-f.

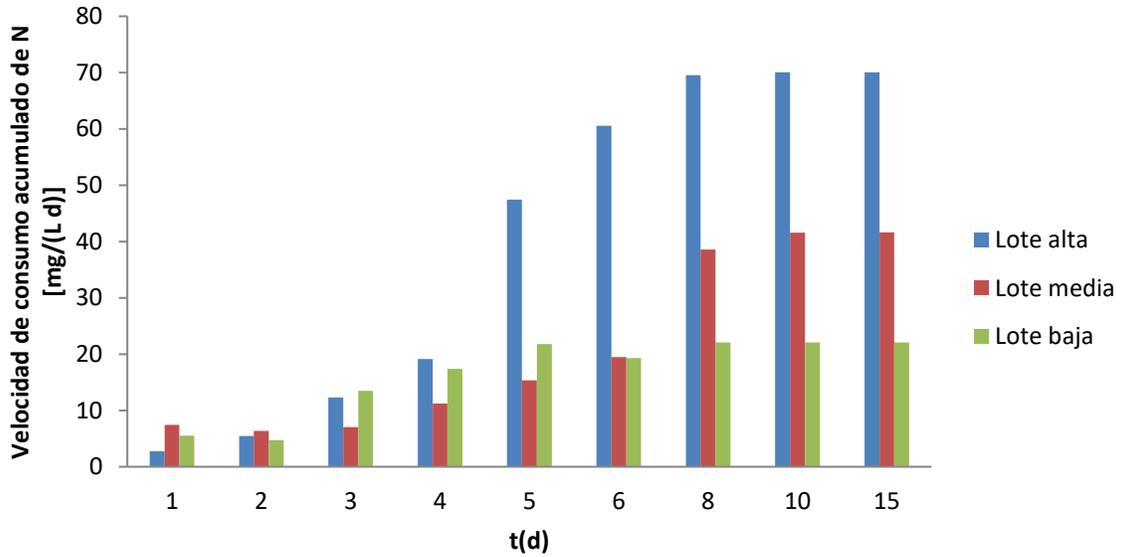
Debido a que el fosfato está directamente relacionado con la cantidad de energía luminosa que es transformada a ATP, además de que participa directamente en el señalamiento de moléculas al interior de la célula, la acumulación de fosfato es otro indicativo de menor iluminación al interior del fotobiorreactor en el cultivo a escala piloto.

### **6.1.3. Consumo acumulado de nutrientes**

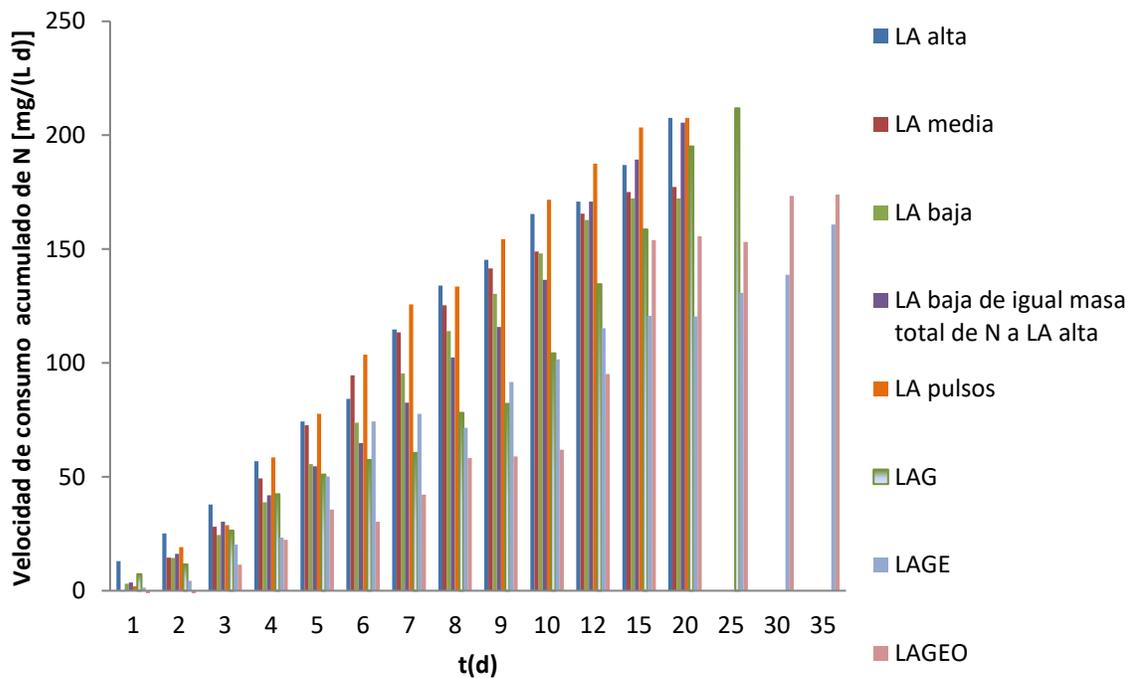
El consumo acumulado de nutrientes es un indicativo de la actividad de la biomasa. Una biomasa más activa consumirá una mayor cantidad de nutrientes del medio en menor tiempo. Para poder comparar los diferentes tratamientos en lote y lote alimentado implementados en diferentes escalas, se ha evaluado el consumo acumulado de N y PO<sub>4</sub>.

El consumo de N en cultivo por lote presentó una relación directamente proporcional a la concentración inicial de nutrientes. Lo anterior implica que la velocidad de consumo de N aumenta al aumentar la concentración inicial de N en el medio (Fig 6). En el caso de cultivo por lote, en todos los tratamientos se alcanzó un consumo acumulado máximo de N entre los días 8-10 de cultivo.

Por lo anterior, se puede decir que la microalga consume más N cuando el mismo se encuentra en mayor concentración en el medio, siendo el consumo de N del tratamiento Lote alta > Lote media > Lote baja. El consumo de N después del día 8 de cultivo fue muy bajo debido a que el N en el medio se había casi agotado en todos los tratamientos en cultivo por lote.



**Figura 6.** Velocidad de consumo acumulado de nitrógeno en cultivo por lote.



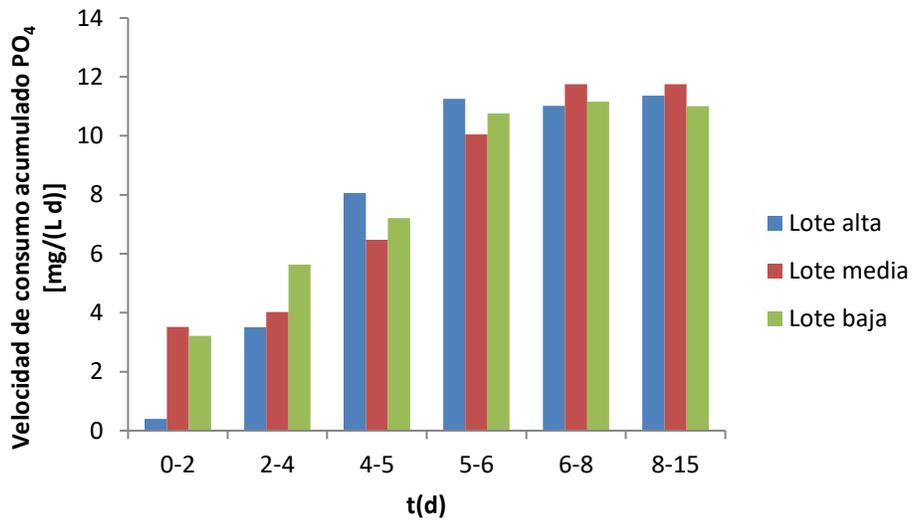
**Figura 7.** Velocidad de consumo acumulado de nitrógeno, en cultivo por lote alimentado en escala laboratorio y piloto, en condiciones controladas y a la intemperie. Lote alimentado por pulsos en escala laboratorio (LA pulsos) y en escala piloto (LAG) en condiciones controladas; Lote alimentado en escala piloto a la intemperie en verano (LAGE); f) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala piloto a la intemperie en verano (LAGE) y otoño (LAGEO).

La velocidad de consumo de N en cultivo por lote alimentado (Fig. 7) fue 3 veces mayor a la de cultivo por lote, esto es en comparación de los tratamientos en lote alimentado LA alta, LA pulsos, LA baja (con igual masa total de N que LA alta), y LAG en comparación contra el tratamiento Lote alta. Cabe señalar que los tratamientos en lote alimentado (LA) mencionados tuvieron la mayor cantidad de masa total de N, es decir la mayor masa total de N. En cultivo por lote alimentado en escala laboratorio, se alcanzó un consumo acumulado máximo de N entre los días 15-20 de cultivo. Y el valor final del consumo acumulado dependió directamente de la cantidad de masa total de N, de igual forma casi todo el N del medio fue consumido en todos los tratamientos. Es decir, en lote alimentado la microalga consume más N cuando la cantidad total de nitrógeno es mayor, independientemente de la concentración de N inicial y de la concentración de N mantenida en el medio. Los tratamientos en escala piloto implementados a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO presentaron una velocidad de consumo de N inferior a la del tratamiento en escala piloto implementado en condiciones controladas (LAG). El tratamiento LAGE, presentó valores inferiores de velocidad de consumo de N al de todos los demás tratamientos en cultivo por lote alimentado durante todo el periodo de cultivo (Fig. 7). Además, hubo un consumo de nutrientes durante un mayor periodo de tiempo en LAGE, hasta el día 35, mientras que en el tratamiento LAG hubo consumo de N y  $PO_4$  hasta el día 25, y en los tratamientos en escala laboratorio solamente hubo consumo hasta el día 20.

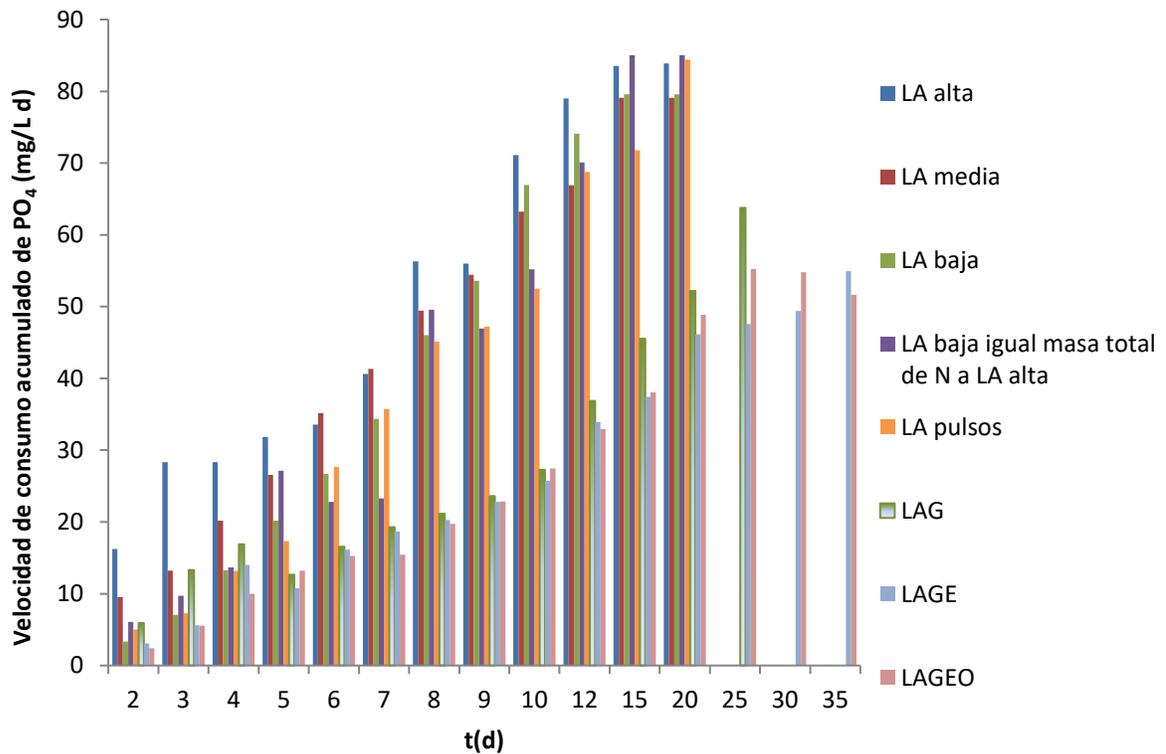
De lo anterior se puede inferir que a mayor masa total de N mayor velocidad de consumo del mismo, independientemente del modo de cultivo empleado, en condiciones controladas de laboratorio, ya sea lote alimentado o lote. También se puede afirmar que la biomasa consume los nutrientes de manera más activa cuando se emplea el lote alimentado.

Pasando al consumo de fosfato, en cultivo por lote no hubo diferencias significativas entre las máximas velocidades de consumo de fosfato (Fig. 8) para los diferentes tratamientos. Se puede observar en la figura 8 que en el tratamiento de Lote alta hubo una mayor velocidad de consumo de fosfato durante los días 2-6 de

cultivo. El consumo acumulado de fosfato en cultivo por lote dependió de la concentración inicial del mismo.



**Figura 8.** Velocidad de consumo acumulado de fosfato, en cultivo por lote.



**Figura 9.** Velocidad de consumo acumulado de fosfato con respecto al tiempo, en cultivo por lote alimentado.

En cultivo por lote alimentado las mayores velocidades de consumo de fosfatos (Fig. 9) se observaron en los tratamientos que tuvieron la mayor concentración de masa total de N, por lo tanto el consumo de fosfato se encuentra relacionado con el consumo de N del medio. Los tratamientos LA alta, LA pulsos y LA baja de igual masa total de N a LA alta, presentaron la mayor velocidad de consumo de fosfato, aproximadamente 84 mg/(L d), la cual fue 7 veces superior a la observada en cultivo por lote.

Por otra parte, en el tratamiento en escala piloto en condiciones controladas (LAG), se presentó una velocidad de consumo acumulada de fosfatos de 63.75 mg/(L d). Los tratamientos en escala piloto implementados a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO presentaron una velocidad de consumo de fosfato inferior a la del tratamiento LAG. Además, hubo un consumo de nutrientes durante un mayor periodo de tiempo en los tratamientos LAGE y LAGEO, hasta el día 35, mientras que en el tratamiento LAG hubo consumo de  $PO_4$  hasta el día 25, y en los tratamientos en escala laboratorio solamente hubo consumo hasta el día 20.

En cultivo por lote alimentado el consumo acumulado dependió de la cantidad total de fosfato, es decir de la cantidad de masa inicial más la cantidad de masa alimentada. También fue evidente al observar las figuras 7 y 9 que el consumo de N y fosfato durante todo el periodo de cultivo fue menor en la escala piloto. Estos resultados hacen evidente que las condiciones a la intemperie, con cambios de luz y temperatura tuvieron un efecto negativo sobre el consumo de nutrientes (N y P) y por lo tanto sobre la actividad de la biomasa. Los tratamientos LA baja y LA media tuvieron un menor consumo ya que la concentración inicial de N en estos tratamientos fue inferior a las de los tratamientos LA baja, LA alta y LA (pulsos de igual cantidad masa total).

#### **6.1.4. Contenido intracelular de nutrientes y la relación Redfield N/P**

La relación de consumo de nitrógeno y el fósforo puede utilizarse como indicativos de la limitación de uno o ambos elementos. En la tabla 2 se muestra el contenido intracelular de N y P de los diferentes tratamientos usados en este estudio. El cálculo fue realizado considerando la concentración inicial de N

determinada por García-Cañedo (2009), un contenido inicial de P de 1% en la biomasa (Powell *et al.*, 2008), y haciendo un balance de masa considerando que la cantidad de nutrientes que es eliminada del medio es totalmente incorporada a la biomasa, hecho demostrado en diversos estudios (García-Cañedo, 2009; Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

**Tabla 2.** Intervalo de porcentaje intracelular de nitrógeno y fósforo en base a peso seco y relación Redfield en microalgas en diferentes modos de cultivo.

	Rango de concentración intracelular de nutrientes		
	N (%)	P (%)	Relación Redfield
Lote	3.66 – 10.78	0.42 – 1.39	5.19 – 17.44
Lote alimentado	4.27 – 19.63	0.5 – 2.08	5.17 – 13.63
Lote alimentado escala piloto en condiciones controladas	5.71 – 13.12	0.52 – 1.43	6.05 – 13.58
Lote alimentado escala piloto a la intemperie	5.17 – 21.84	1 – 2.45	4.78 – 14
Genero <i>Scenedesmus</i>	2 – 10 <sup>a</sup>	0.41 – 3.16 <sup>b</sup>	5 – 19 <sup>c</sup>
<i>Scenedesmus</i> sp. LX1	10 – 25 <sup>d</sup>	0.5 – 2.5 <sup>d</sup>	5 -14 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Ahlgren y Hyenstrand, 2003; <sup>b</sup> Powell *et al.*, 2008 y 2011.

<sup>c</sup> Geider y La Roche, 2002, relación Redfield de fitoplancton sin limitación de N y/o P.

<sup>d</sup> Wu *et al.*, 2012.

El contenido de nitrógeno reportado para el género *Scenedesmus* es muy variable, y depende de la concentración de nitrógeno del medio de cultivo, pudiendo tener un valor desde 2 hasta 20% en peso seco (Ahlgren y Hyenstrand, 2003; Wu *et al.*, 2012). De la misma forma, las microalgas contienen típicamente 1% de P en peso seco (PS), cuando no hay acumulación de P en la biomasa. Sin embargo, bajo ciertas condiciones pueden consumir más N y P del que se requiere para su crecimiento, que almacenan en la forma de nitrato y polifosfato (García-Cañedo, 2009; Powell *et al.*, 2008 y 2011).

Es importante señalar que normalmente se considera que la remoción de N y P del medio de cultivo es utilizada por las microalgas para el crecimiento, sin embargo, un consumo elevado de nutrientes no necesariamente resulta en una alta producción de biomasa (Wu *et al.*, 2012). Lo anterior se conoce como “consumo de

lujo” (luxury uptake) (Powell *et al.* 2008 y 2011; Hong *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). El consumo de lujo de nutrientes fue definido por Levin y Shaphiro (1965) como el consumo de nutrientes con la ausencia de crecimiento sin una deprivación previa de los mismos, aunque hoy en día también se considera consumo de lujo cuando se consumen nutrientes y se almacenan intracelularmente. Esta forma de consumo excesivo de nutrientes en microalgas, superior a los requeridos por la célula para su crecimiento se presenta cuando las células han estado expuestas a un medio con poca o casi nula concentración de ciertos nutrientes (starvation) o cuando las células tienen la capacidad de acumular nutrientes, en éste último caso no se requiere una deprivación de nutrientes previa (Eixler *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2009). Está demostrado que el “consumo de lujo” de N y P ocurre frecuentemente tanto en macroalgas como en microalgas y puede ser considerado como un mecanismo biológico para la asimilación tanto de N como de P (Menéndez *et al.*, 2002; Buapet *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2011).

García-Cañedo (2009) ha demostrado, con mediciones en TOC (total organic carbón analyzer), que la microalga *Scenedesmus incrassatulus* puede llegar a contener en su biomasa hasta el 18% de N en peso seco, y que consume todo el N del medio, incorporándolo a la biomasa, demostrando el “luxury uptake” de N por la microalga *Scenedesmus incrassatulus* usada en este estudio. Asimismo, la concentración de N intracelular (Tabla 2) en cultivo por lote se mantuvo muy cercana a los valores reportados para otras microalgas del género *Scenedesmus*. Mientras que en lote alimentado el valor fue de hasta casi 2 veces superior a la de cultivo por lote en este trabajo, y similar en magnitud al máximo de 18% en base seca reportado en otras investigaciones (Ahlgren y Hyenstrand, 2003; García-Cañedo 2009; Wu *et al.*, 2012). Esto confirma que la acumulación de N y que el contenido intracelular de N en lote alimentado se encuentra dentro del intervalo reportado para la otras cepas del género *Scenedesmus*.

Powell *et al.* (2008) demostraron que las microalgas del género *Scenedesmus* pueden contener entre 0.41 y 3.16% de P en peso seco, demostrando el consumo de lujo de P. Estos autores también demostraron que el consumo de lujo de P en *Scenedesmus* sp. se presenta tanto en escala laboratorio como en escalas

industriales, y que las microalgas tienen un contenido de 1% de fósforo en ausencia de consumo de lujo del mismo. Podemos observar en la tabla 2 que en todos los tratamientos la concentración intracelular de P se encuentra dentro de los rangos reportados para otras microalgas del género *Scenedesmus* para las cuales se ha demostrado el consumo de lujo de fosfato (Powell *et al.*, 2008 y 2011; Wu *et al.*, 2012), lo que nos permite afirmar que el P pudo ser consumido y acumulado dentro de la biomasa, tanto en escala laboratorio como en escala piloto e inclusive a la intemperie.

Es claro que *Scenedesmus incrassatulus* puede almacenar N y P en su biomasa, ya que se ha detectado que puede contener hasta 19% de N y 2% de P, lo que concuerda con los reportes de diversos autores (Geider y La Roche, 2002; García-Cañedo, 2009; Powell *et al.*, 2008, 2009 y 2011).

El N y el P intracelular pueden encontrarse formando parte de compuestos o en forma inorgánica. Las principales formas en las que se encuentra el N orgánico dentro de la biomasa (Tabla 3) es formando parte de proteínas y ácidos nucleicos, además de que se encuentra presente en la clorofila *a* y *b*, aminoácidos y osmolitos que contienen N (glicina y betaina). El N inorgánico también puede contribuir al N intracelular, particularmente en células que pueden almacenar nitrato, para posteriormente usarlo para su crecimiento.

El P orgánico intracelular (Tabla 3) se encuentra en los ácidos nucleicos o fosfolípidos, y está casi ausente de las proteínas excepto cuando se enlaza reversiblemente a ellas (fosforilación de proteínas y enzimas). El ácido ribonucleico (ARN) es la fracción macromolecular más abundante en la célula que contiene P, seguida por los fosfolípidos y el ácido desoxyribonucleico (ADN). Además, existen algunas reservas de P como acarreadores de sustratos, energía e información (glucosa fosfato, coenzimas, ATP, cAMP, etc.). El fosfato también puede almacenarse como polifosfato (Geider y La Roche, 2002). En un estudio realizado por Rhee (1973) sobre la distribución intracelular de P en *Scenedesmus* sp., se determinó que cerca del 30% del P de la célula estaba asociado con el ARN, menos del 5% con fosfolípidos, y la mayor parte, 40%, estaba asociada con polifosfatos,

pero las proporciones de P variaban dependiendo de si el P era limitante. Powell *et al.* (2009) demostraron que el P se acumula en microalgas en forma de polifosfato, soluble e insoluble en ácidos, y que durante etapas de crecimiento rápido el polifosfato acumulado es subsecuentemente utilizado para la producción de componentes celulares, como por ejemplo fosfolípidos, ácidos nucleicos y nucleótidos. También, el N puede ser acumulado en forma de nitrato y después ser utilizado para sintetizar proteínas y otras macromoléculas (Hong *et al.*, 2011).

**Tabla 3.** Composición elemental y porcentaje de masa celular de microalgas asociada a diferentes componentes moleculares que contienen nitrógeno y/o fósforo.

	Composición elemental	% de masa celular	gN/g PS	gP/g PS
Aminoácidos	Variable	0-12	-	-
Proteínas <sup>a</sup>	C <sub>4.43</sub> H <sub>7</sub> O <sub>1.44</sub> N <sub>1.16</sub> S <sub>0.019</sub>	30-65	0.16	-
ARN <sup>b</sup>	C <sub>9.5</sub> H <sub>13.75</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3.75</sub> P	3-15	0.155	0.091
ADN <sup>c</sup>	C <sub>9.75</sub> H <sub>14.75</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3.75</sub> P	0.5-3	0.16	0.095
Fosfoglicéridos <sup>d</sup>	C <sub>37.9</sub> H <sub>72.5</sub> O <sub>9.4</sub> N <sub>0.43</sub> P	5-15	0.008	0.043
Clorofila <i>a</i>	C <sub>55</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Mg	0.2-5	0.063	-
Clorofila <i>b</i>	C <sub>55</sub> H <sub>70</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> Mg	-	0.062	-
ATP	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>13</sub> N <sub>5</sub> P <sub>3</sub>	<0.1	0.14	0.18

<sup>a</sup> Composición basada en la estructura de 21 aminoácidos y su abundancia relativa en proteínas de microalgas

<sup>b</sup> Asumiendo igual cantidad de moles de ácidos deoxyadenilico, deoxycitidílico, deoxyguanílico y deoxytimínico.

<sup>c</sup> Asumiendo igual cantidad de moles de ácidos adenílico, citidílico, guanílico y uridílico.

<sup>d</sup> Asumiendo igual cantidad de moles de P en fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

Adaptado de: Geider y La Roche (2002).

PS= Peso seco

La diferencia entre el consumo y el almacenamiento de nitrógeno y fósforo inevitablemente ocasiona cambios en la relación N/P intracelular (Wu *et al.*, 2012). Esto se conoce como la relación Redfield, este es un concepto que relaciona la composición de los organismos con la química del agua, esta relación fue nombrada en honor a Alfred Redfield quien concluyó en 1958 que la composición del plancton era uniforme, desde un punto de vista estadístico. Los biólogos usan una relación Redfield de 16:1 N:P, basada en la composición elemental de microorganismos marinos y de agua dulce. Normalmente se asume que el N está limitado a N:P<16

y que el P está limitado a  $N:P > 16$ . También se considera una relación N:P crítica donde ambos nutrientes son limitantes del crecimiento al mismo tiempo (Geider y La Roche, 2002).

Algunos autores hacen incapié en que los organismos pueden desviarse de la relación Redfield 16:1 (Broecker y Henderson, 1998) y el grado de desviación es crítico para nuestro entendimiento del consumo de nutrientes (Falkowski, 2000). La habilidad de las algas de disminuir las concentraciones de nutrientes a niveles indetectables dentro de un amplio rango de relaciones N:P hace aún más difícil determinar el punto de limitación de N o P, y la relación crítica de N:P (Geider y La Roche, 2002).

La dinámica de los nutrientes N y P está muy relacionada entre ellos y al proceso de captación de luz presente en los fotobiorreactores. Explorar el destino del N y otros nutrientes en las diferentes rutas metabólicas durante el cultivo de microalgas en fotobiorreactores es una herramienta muy valiosa para el diseño de estos sistemas a escala industrial, con una demanda reciente de sistemas con eficiente uso de nutrientes y luz. Debido a esto, es vital conocer el verdadero metabolismo de los nutrientes y su efecto sobre el crecimiento de microalgas cultivadas en fotobiorreactores (Krustok *et al.*, 2016).

Además, la relación N:P intracelular crítica no es una constante biológica y la variabilidad de la composición N/P de microalgas puede presentarse debido a cambios en la concentración de macromoléculas que contienen N y P, o por la acumulación como reserva de nutrientes (nitrato y fosfato) o energía., como una respuesta a las condiciones de luz (Geider *et al.*, 1996).

El análisis de la composición elemental de cultivos de fitoplancton marino indican que: 1) el rango fisiológico de N:P es menor a 5 bajo severa limitación de N y es mayor a 100 en severa limitación de P; 2) la relación N:P de fitoplancton con suficiente disponibilidad de nutrientes (sin limitación) varía de 5 a 19, siendo la mayoría de las determinaciones experimentales menores a la relación Redfield 16:1; 3) la relación crítica de N:P, donde ambos nutrientes son limitantes es de 20 a 50 (Geider y La Roche, 2002).

En nuestro estudio se ha encontrado que la relación Redfield presentó valores en un rango de 4.78 - 17.44 (Tabla 1), estos valores concuerdan con los presentados por otros autores (Geider y La Roche, 2002; Wu *et al.*, 2012) cuando no hay limitación de N ni de P, por lo que puede decirse que en el medio en lote alimentado no hubo limitación de N y/o P, o fue ésta fue mínima, además en anteriores reportes ya se ha mencionado que la luz muy probablemente sea el limitante del crecimiento. Se ha reportado que *Scenedesmus obliquus* alcanza la productividad óptima de biomasa en cultivo por lote con una relación N:P de entre 9-13, y este intervalo de relación N:P es el que permite el agotamiento de los nutrientes del medio (Arbib *et al.*, 2013).

Por otra parte, al comparar el rango de la relación Redfield de 6.05 – 13.58 y 4.78 – 14 de los tratamientos en escala piloto en condiciones controladas (LAG) y a la intemperie (LAGE), respectivamente, se puede afirmar que las condiciones variables de luz y temperatura que se presentaron a la intemperie tienen un efecto nulo o despreciable sobre la relación Redfield.

Como comentario final de esta sección, podemos afirmar que los nutrientes son consumidos rápidamente cuando están disponibles, pero que son almacenados para después ser usados para el crecimiento y síntesis de proteínas. Es importante señalar que el contenido proteico, y por lo tanto de N, no puede variar de manera independiente del contenido de pigmentos y de ácidos nucleicos de las células. Es por esto que la cantidad de N varía junto con la cantidad de P. Debido a que los ácidos nucleicos, que contienen una gran cantidad de P, están generalmente asociados con una masa igual de proteínas (histonas, cromatinas y ribosomas) es de esperarse que los ácidos nucleicos y el contenido de proteínas presenten una co-variación y sean más abundantes en células en crecimiento.

## **6.2. Condiciones ambientales de luz y temperatura a la intemperie**

Al implementar el cultivo de microalgas a la intemperie, el mismo quedó expuesto a las variaciones de luz y temperatura de las condiciones ambientales. Por lo tanto, se registraron las principales condiciones de cultivo que presentaron variación a la intemperie: 1) Irradiación solar, es decir la cantidad de luz que incide

sobre el fotobiorreactor, y 2) la temperatura del ambiente a la que se encuentra expuesta el fotobiorreactor.

Las condiciones ambientales (Tabla 4 y 5) fueron registradas en la mañana (entre 8 y 9 am), medio día (entre 12 y 1 pm), y tarde (entre 5 y 7 pm), de acuerdo con la presencia o ausencia de nubes y lluvia como sigue: 1) Soleado, cielo sin presencia de nubes que disminuyeran la irradiación solar sobre el fotobiorreactor; 2) Medio nublado, cielo con presencia de nubes dispersas que disminuían ocasionalmente la irradiación solar sobre el fotobiorreactor durante periodos cortos de tiempo (minutos); 3) Nublado, cielo totalmente cubierto de nubes que disminuían la irradiación solar sobre el fotobiorreactor de manera continua; 4) Lluvioso, cielo totalmente cubierto de nubes con presencia de lluvia, las cuales disminuían la irradiación solar sobre el fotobiorreactor de manera continua, 5) Lluvioso con granizo, cielo totalmente cubierto de nubes con presencia de lluvia y granizo, condiciones que disminuían la irradiación solar sobre el fotobiorreactor de manera continua.

**Tabla 4.** Condiciones ambientales durante cultivo a la intemperie verano.

Mañana	Mediodía	Tarde
17 mañanas con condiciones soleadas	14 mediodías con condiciones soleadas	10 tardes con condiciones soleadas
8 mañanas con condiciones medio nubladas	12 mediodías con condiciones medio nubladas	4 tardes con condiciones medio nubladas
10 mañanas con condiciones nubladas y/o lluviosas	10 mediodías con condiciones nubladas y/o lluviosas	22 tardes con condiciones medio nubladas lluviosas, nubladas y/o lluviosas (en 2 ocasiones hubo lluvia con granizo)

**Tabla 5.** Condiciones ambientales durante cultivo a la intemperie en otoño.

Mañana	Mediodía	Tarde
21 mañanas con condiciones soleados	26 mediodías con condiciones soleados	20 tardes con condiciones soleados
5 mañanas con condiciones medio nubladas	6 mediodías con condiciones medio nubladas	9 tardes con condiciones medio nubladas
10 mañanas con condiciones nubladas	5 mañanas con condiciones nubladas	8 mañanas con condiciones nubladas

Al ver las tablas 4 y 5 se hace evidente que durante las mañanas predominaron las condiciones soleadas a medio nubladas. Durante el medio día se tuvo la misma tendencia, pero con un número mayor de mediodías medio nublados. Sin embargo, en verano predominaron las tardes con condiciones de medio nublado lluvioso, nublado y nublado lluvioso, mientras que en otoño las tardes fueron mayormente soleadas.

**Tabla 6.** Irradiación solar a la intemperie en verano.

Condiciones	Lado	Irradiación solar ( $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{ s})$ )			
		Mañana (8-9am)	Mediodía (12-1pm)	Tarde (5-7pm)	Máxima (12-1pm)
Soleado	A	180±68.09	1366.66±217.25	2404±1472.19	2409±314.88
	B	115.66±42.71	334.88±197	238±59.39	
Nublado o lluvioso	A	120.5±13.43	432.8±135.85	230.5±37.47	474±233.11
	B	81.5±20.50	115±42.4	70.5±23.33	
Resumen de Rango de condiciones	Soleado	254-120	1700-1088	2404-238	2846-1910
	Nublado o lluvioso	130-111	563-205	257-204	617-205

“A” lado del fotobiorreactor expuesto directamente a la luz solar

“B” lado del fotobiorreactor que no se encuentra directamente a la luz solar.

**Tabla 7.** Irradiación solar a la intemperie en otoño.

Condiciones		Irradiación solar ( $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{ s})$ )			
		Mañana (8-9am)	Mediodía (12-1pm)	Tarde (5-7pm)	Máxima (12-1pm)
Soleado	A	233.1±138.8	2339.4±562.4	1488.91±511.07	2549.33±326.8
	B	43.44±25.71	190.94±64.22	98.58±31.98	
Nublado o lluvioso	A	178.28±107.9	481±60.9	259.8±172.7	1228.5±864.8
	B	30.57±13.5	90.33±13.6	36.66±22.20	
Resumen de Rango de condiciones	Soleado	475-132	3018-1065	2264-762	3018-1938
	Nublado o lluvioso	362-77	533-414	591-65	1840-617

“A” lado del fotobiorreactor expuesto directamente a la luz solar

“B” lado del fotobiorreactor que no se encuentra directamente a la luz solar.

La irradiación solar de las condiciones ambientales anteriores se caracterizó como se muestra en las tablas 6 y 7. Es importante hacer notar que independientemente de la geometría del fotobiorreactor, en cultivo en exteriores con iluminación solar siempre habrá un lado del fotobiorreactor que se encuentre

expuesto directamente a la luz solar (lado A), y un lado que no se encuentre expuesto directamente a la luz solar (lado B), por lo tanto, el intervalo de cantidad de luz que recibe el fotobiorreactor será desde el lado con menor iluminación hasta el lado con mayor iluminación.

Por otra parte, las condiciones de temperatura (Tablas 8 y 9) presentaron mayor variación durante los días soleados. Cuando las condiciones ambientales eran de medio nublado, nublado y/o lluvioso tendían a la temperatura más baja debido principalmente al efecto de sombreado provocado por las nubes y el viento frío que generalmente acompaña a estas condiciones ambientales.

**Tabla 8.** Condiciones promedio de temperatura durante verano, en un día soleado a la intemperie.

Temperatura (°C)*				
Mañana (8-9am)	Mediodía (12-1pm)	Tarde (5-7pm)	Máxima	Mínima
14.04±2.29	22.01±3.063	35.62±0.76	36.6	9.6

\*Las temperaturas son un promedio de las que se presentaron cuando el día fue soleado o medio nublado. En condiciones lluviosas o Nubladas la temperatura descendía a la mínima o la que se presentaba en el mañana.

**Tabla 9.** Condiciones promedio de temperatura durante otoño, en un día soleado a la intemperie.

Temperatura (°C)*				
Mañana (8-9am)	Mediodía (12-1pm)	Tarde (5-7pm)	Máxima	Mínima
13.39±3.38	31.09±3.68	30.92±4.48	36.3	9.4

\*Las temperaturas son un promedio de las que se presentaron cuando el día fue soleado o medio nublado. En condiciones lluviosas o Nubladas la temperatura descendía a la mínima o la que se presentaba en el mañana.

Es importante mencionar que la temperatura promedio del ambiente depende de la ubicación geográfica; el caso del valle de México, en la Ciudad de México, corresponde a la de un valle alto y tiene un rango de 14.4-15.1°C (Ruiz-Corral, 2012). Esto hace evidente que en el valle de México la temperatura se encuentra la mayor parte del día por debajo de 25°C (temperatura promedio usada en cultivo en condiciones de laboratorio), presentando la temperatura máxima de 36°C solamente en días soleados durante la tarde (5-7 pm).

Aunque las condiciones de luz y temperatura registradas durante este estudio a la intemperie son consideradas extremas, la microalga *Scenedemus incrassatulus* logró sobrevivir y crecer, aunque a velocidades específicas de crecimiento menores y durante periodos de tiempo diferentes que en condiciones controladas. Se ha reportado que los fotobiorreactores a la intemperie pueden alcanzar temperaturas de 10 a 30°C superiores a la del ambiente (Wang *et al.*, 2012). Fernández-Sevilla *et al.* (2010) registraron que la cepa *Scenedesmus almeriensis* tiene la capacidad de sobrevivir condiciones de temperatura de 10 a 45°C, y de luz de hasta 1625  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2 \text{ s})$ . Las condiciones de luz y temperatura registradas en este estudio dejan claro que la cepa *Scenedesmus incrassatulus* puede soportar temperaturas similares a la cepa *S. almeriensis*. También, con el diseño de fotobiorreactor empleado a la intemperie la cepa utilizada en este estudio es capaz de soportar condiciones de irradiación de hasta 3018  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2 \text{ s})$ , que son mayores a lo reportado para la cepa *S. almeriensis*, debido posiblemente a que las células de microalgas en este trabajo no se encontraban expuestas todo el tiempo a la cantidad de luz más alta, gracias al diseño de fotobiorreactor usado.

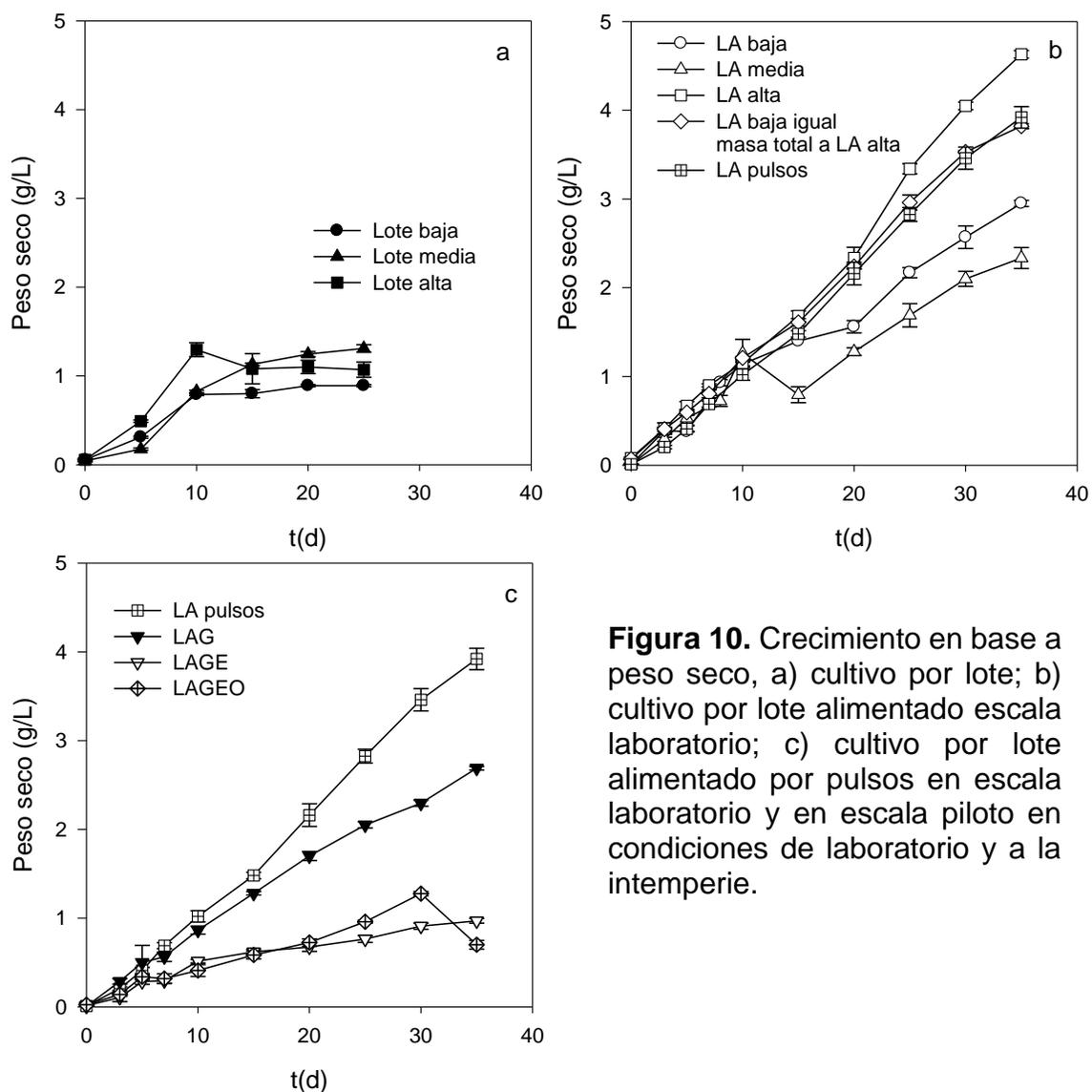
### **6.3. Crecimiento**

#### **6.3.1. En base a peso seco**

El crecimiento en base a peso seco mostró variaciones como consecuencia de las condiciones de cultivo implementadas en los diferentes tratamientos. En cultivo por lote (Fig.10a), la máxima cantidad de biomasa fue de 1.3 g/L. Este valor fue la máxima concentración de biomasa obtenida para los tratamientos Lote alta y Lote media. Por otra parte, en cultivo por Lote baja se obtuvo únicamente 0.8 g/L. Por lo tanto, el tratamiento en cultivo por lote donde se generó la mayor cantidad de biomasa en menor tiempo fue Lote alta. Esto indica que emplear mayor cantidad de nitrógeno inicial en el medio, permitió la obtención de mayor cantidad de biomasa en peso seco en menor tiempo.

En cultivo por lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 10b) todos los tratamientos presentaron un valor promedio de peso seco de 1.18 g/L, al día 10 del cultivo, no habiendo diferencia significativa ( $p=0.05$ ) entre los diferentes

tratamientos. Por lo tanto, en estos tratamientos hubo aproximadamente la misma concentración de peso seco durante el periodo de alimentación de medio. Los tratamientos en lote alimentado en escala laboratorio presentaron diferencias en la concentración de peso seco después de haberse suspendido la alimentación.



**Figura 10.** Crecimiento en base a peso seco, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

La concentración de biomasa en peso seco al final en los cultivos por lote alimentado fue superior a la obtenida en cultivo por lote, presentándose valores de 2.95, 2.33 y 4.63 g/L para los tratamientos de LA baja, LA media y LA alta, respectivamente. Mientras que en los tratamientos LA pulsos y LA (baja de igual masa total de N a LA alta) se obtuvo 3.92 y 3.82 g/L. Estos valores fueron superiores

desde 1.5 hasta 3.56 veces con respecto al máximo valor obtenido en Lote alta. Los resultados obtenidos en este estudio son similares en magnitud a lo reportado en un estudio sobre la cepa *Desmodesmus* sp. LX1 en lote alimentado de 4.04 g/L (Xie *et al.*, 2013). Lo que demuestra que la implementación de lote alimentado favorece una mayor concentración de biomasa que cultivo por lote.

Al Comparar el resultado del tratamiento LA media de 2.33 g/L con la cantidad biomasa de 2.46 reportada por García-Cañedo (2009), empleando lote alimentado con 1.5% de CO<sub>2</sub> en el aire de alimentación, se constató que no hubo diferencia significativa ( $p=0.05$ ). Esto implica que la máxima concentración de biomasa en base a peso seco obtenida por García-Cañedo (2009) y la obtenida en el tratamiento LA media son iguales estadísticamente. Es decir, incrementar la concentración de CO<sub>2</sub> del aire de entrada de 0.03% a 1.5%, no aumenta de manera significativa la cantidad máxima de biomasa obtenida en cultivo por lote alimentado. Esto se confirma al comparar los resultados en lote alimentado con lo reportado por De Morais y Costa (2007) sobre *Scenedesmus ubliquus* en los que lograron obtener 2.12 g/L de biomasa seca empleando aire con 12% de CO<sub>2</sub>, por lo que los resultados en lote alimentado implementadas en este estudio sin incremento de CO<sub>2</sub> en el aire de alimentación son superiores que al emplear CO<sub>2</sub>.

Lo anterior se puede explicar debido a la existencia de mecanismos de concentración de dióxido de carbono (CCM) en las microalgas. Los CCM han evolucionado en los organismos fotosintéticos para aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> en el sitio donde se encuentra la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), principalmente debido a la baja afinidad de la misma por el CO<sub>2</sub>. Los CCM's utilizan transporte activo de carbono inorgánico dependiente de energía, para incrementar la concentración intracelular de CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> al ser introducido dentro de la célula se transforma en bicarbonato, este último se acumula en el interior de la célula, para que la enzima Rubisco pueda utilizarlo posteriormente. La enzima anhidrasa carbonica (CA, carbonic anhydrase en inglés) cataliza la deshidratación del bicarbonato y provee CO<sub>2</sub> para la carboxilación de ribulosa-1,5-bifosfato por Rubisco (Spalding, 2008). Por ejemplo, se ha identificado que en la ausencia en el lumen del tilacoide de CAH3, uno de los componentes

esenciales del CCM en *C. reinhardtii*, el carbono inorgánico interno puede acumularse en altos niveles pero no es disponible para la asimilación de CO<sub>2</sub> (Hanson *et al.*, 2003).

Por lo tanto, a pesar de que el CO<sub>2</sub> es limitante para que se presente una alta tasa fotosintética, típicamente no es limitante del crecimiento en plantas terrestres y en microalgas (Spalding, 2008) debido a la existencia de mecanismos concentradores de carbono y a que otros nutrientes pueden ser limitantes, como por ejemplo luz, nitrógeno y/o fósforo.

AL comparar los tratamientos LA alta y LA baja (de igual masa total de N alimentada a LA alta), se comprobó que no hubo diferencia significativa en la concentración de biomasa en peso seco desde el inicio hasta el día 20 de cultivo, es decir durante el periodo de alimentación. Y al comparar los tratamientos LA pulsos contra LA baja (de igual masa total de N alimentada a LA alta), se pudo notar que tampoco hubo diferencia significativa en la concentración de biomasa en peso seco, en este caso durante todo el periodo de cultivo. Esto nos indica que la concentración inicial de N, la concentración de N mantenida en el medio, la masa total de N y el modo de alimentación no tienen un efecto directo sobre el crecimiento en base a peso seco durante este tiempo. Solo puede observarse el efecto sobre el crecimiento de los tratamientos al final del cultivo.

Para explicar esto es importante mencionar que generalmente se espera que cuando se agrega más sustrato, en este caso N, se obtenga más crecimiento, aclarando que esta aseveración es verdadera sólo y sólo si el sustrato que se agrega es el único limitante. Por lo tanto, con los resultados obtenidos queda claro que el N deja de ser el nutriente limitante del crecimiento en cultivo por lote alimentado, y se piensa que la interacción del factor N con otros factores, por ejemplo la cantidad de energía luminosa irradiada al fotobiorreactor, es la responsable del resultado final observado en el peso seco.

En la figura 10c se puede observar que la concentración de biomasa del tratamiento en escala piloto LAG alcanzó un valor máximo de 2.7 g/L, lo que equivale a una cantidad de 68% de lo obtenido en el tratamiento LA pulsos en escala

laboratorio. Aunque es importante resaltar que el tratamiento LAG ya contaba con una concentración de biomasa de 1.28 g/L al día 15 de cultivo, esta cantidad de biomasa se puede considerar alta y de magnitud similar a la del tratamiento LA pulsos que al mismo tiempo de cultivo contaba con una concentración de 1.48 g/L.

Los tratamientos implementados a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO sólo alcanzaron una concentración de biomasa de 0.97 y 1.27 g/L, respectivamente. Por lo que la cantidad de biomasa obtenida a la intemperie fue de 36 y 47% de lo obtenido en condiciones controladas de laboratorio en la misma escala de cultivo.

Lo anterior indica que las condiciones variables de luz y temperatura que se presentaron a la intemperie tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento en base a peso seco y a número de células, los cuales se pueden observar en las figuras 10 y 11.

Es de resaltar que el máximo crecimiento en base a peso seco determinado en este estudio fue 4.63 g/L, 2 veces superior a lo reportado para *Scenedesmus obliquus* de 2.12 g/L (De Morais y Costa, 2007), también es superior a las concentraciones reportadas para *Scenedesmus almeriensis* de entre 0.7-2 g/L (Acién *et al.*, 2012) y a *Desmodesmus* sp. de 4.04g/L (Xie *et al.*, 2013).

### **6.3.2. Productividad de biomasa**

Las productividades volumétrica y por unidad de área de biomasa fueron evaluadas durante los primeros 10 días de cultivo (Tabla 10).

En cultivo por lote se obtuvo una productividad máxima de 0.12 g/(L d) en el tratamiento Lote alta. Y se observó que la productividad de biomasa en cultivo por lote fue mayor al incrementar la concentración inicial de N.

En lote alimentado en escala laboratorio la productividad de biomasa fue de 0.1 a 0.125 g/(L d), y no se observó una relación directa con el N.

En escala piloto condiciones controladas (LAG) se obtuvo una menor productividad volumétrica que en los cultivos en escala laboratorio, pero la productividad por unidad de área fue superior, esto se debe a la disposición

geométrica del fotobiorreactor. El reactor tenía una disposición tubular vertical permitiendo un mayor volumen en un área más pequeña. Los cultivos implementados a la intemperie tuvieron menor productividad, la cual fue de una magnitud de entre 44-56% de la obtenida en condiciones controlada. Es decir, las condiciones variables de luz y temperatura afectaron negativamente a la productividad. Por último, comparando los cultivos implementados a la intemperie, hubo mayor productividad en verano que en otoño, tanto volumétricamente como por unidad de área.

**Tabla 10.** Productividad máxima de biomasa de *Scenedesmus incrassatulus*.

Escala	Tratamiento	Productividad volumétrica (g/L d)	Productividad por unidad de área (g/m <sup>2</sup> d)
Laboratorio	Lote baja	0.073	14.97
	Lote media	0.078	15.91
	Lote alta	0.124	25.26
	LA baja	0.113	23.02
	LA media	0.125	25.46
	LA alta	0.107	21.8
	LA baja (igual masa total a LA alta)	0.114	23.24
	LA pulsos	0.101	20.55
Piloto (condiciones controladas)	LAG	0.086	33.16
Piloto (intemperie verano)	LAGE (verano)	0.050	19.32
Piloto (intemperie otoño)	LAGEO	0.038	14.92

Productividades máximas calculadas para los primeros 10 días de cultivo.

Comparando productividades de este estudio con un rango entre 0.05-0.12 g/(L d), vemos que estas son bajas ya que para la cepa *Scenedesmus almeriensis* se han reportado productividades volumétricas de entre 0.3-0.7 g/(L d), equivalentes a una productividad por unidad de área de 15-45 g/(m<sup>2</sup> d), en condiciones de invernadero (Acién *et al.*, 2012), mientras que para *Scenedesmus obliquus* se han

reportado productividades de 0.004-0.74 g/(L d) y para *Scenedesmus quadricauda* 0.19 g/(L d) (Varfolomeev *et al.*, 2011). Se ha reportado una productividad de 7.68 g/(m<sup>2</sup> d), en un fotobiorreactor tipo “facade” utilizando *Chlorella vulgaris*, lo que corresponde a 25-30 toneladas de biomasa por hectárea por año (Provust *et al.*, 2016). Aún así las productividades volumétrica y por unidad de área determinadas en este estudio sobre *Scenedesmus incrassatulus*, se encuentran en concordancia y dentro del intervalo de las productividades reportadas para otras cepas de *Scenedesmus*. También se vislumbra que con el uso de invernaderos (control de temperatura y luz atenuada) y suministrando CO<sub>2</sub> se pudieran aumentar las productividades de la cepa *S. incrassatulus*.

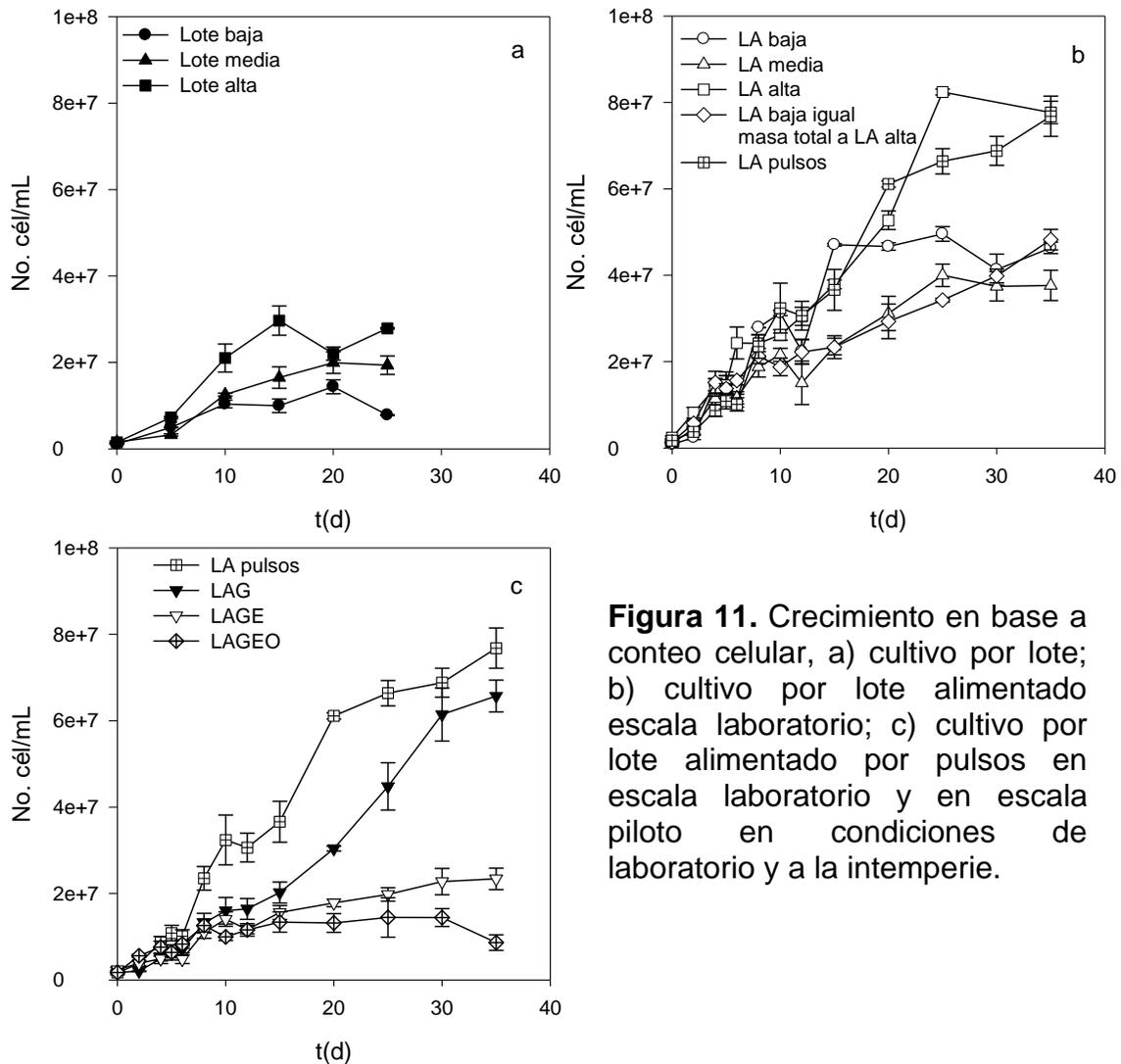
### **6.3.3. En base a conteo celular**

La concentración de biomasa también fue evaluada a partir del conteo celular. En cultivo por lote las máximas magnitudes de concentración celular fueron de 14.3, 19.9 y 29.6 x 10<sup>6</sup> cél/mL, para los tratamientos Lote baja, Lote media y Lote alta, respectivamente (Fig. 11a).

En lote alimentado las máximas concentraciones celulares fueron de 47, 40 y 82 x 10<sup>6</sup> cél/mL para LA baja, LA media y LA alta, respectivamente (Fig. 11b), las cuales resultaron 1.58, 1.3 y 2.77 veces mayores, respectivamente, con respecto a la concentración celular máxima de Lote alta. El tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta) presentó un valor máximo de 48.24 x 10<sup>6</sup> cél/mL, y no tuvo diferencia significativa (p=0.05) con respecto a la concentración celular del tratamiento LA baja, ambos tratamientos presentaron una concentración celular inferior 1.66 veces a la del tratamiento LA alta.

Esto significa que la alimentación de medio dio como resultado altas concentraciones celulares, e indica que mantener una concentración superior de N en el medio resulta en mayor división celular, lo que implica que deben existir mecanismos de división celular que se encuentran relacionados con la concentración de N en el medio. Por una parte puede resultar benéfico para la producción de pigmentos carotenoides, ya que más células significan más aparatos fotosintéticos que requieren una mayor cantidad de pigmentos para su

funcionamiento eficiente; sin embargo, a mayor concentración celular es más probable que ocurra limitación de luz en el cultivo debido al efecto de autosombreado de las células entre ellas. Esto último se confirmó con el hecho de que en el tratamiento LA pulsos (Fig. 11b y c) se obtuvo  $76.8 \times 10^6$  cél/mL, demostrando que los tratamientos LA alta y LA pulsos fueron en los que se obtuvo la mayor concentración celular, lo cual se puede atribuir a que estos tratamientos tuvieron la mayor concentración de N en el medio.



Por otra parte, en cultivo en escala piloto (Fig. 11c), la concentración celular alcanzada al final del cultivo del tratamiento LAG fue de  $65.72 \times 10^6$  cél/mL, esta

cantidad fue 85% de la cantidad obtenida en el tratamiento LA pulsos implementado a menor escala.

Los tratamientos a la intemperie en verano, LAGE, y en otoño, LAGEO, presentaron una concentración celular máxima de 23.4 y 14.4 x 10<sup>6</sup> cél/mL, respectivamente; es decir, menores y siendo 35.6 y 22% de la cantidad obtenida en condiciones controladas. Como estas cantidades fueron menores a las observadas en condiciones controladas de laboratorio resulta evidente que tanto el crecimiento en base a peso seco como el basado en conteo celular, se vieron afectados negativamente por las condiciones variables de luz y temperatura que se presentaron a la intemperie.

Se comparó la concentración celular máxima obtenida en el presente estudio con la concentración celular máxima reportada por García-Cañedo (2009) de 77.6 x 10<sup>6</sup> cél/mL, donde se empleó 1.5% de CO<sub>2</sub> en el aire de alimentación, y no se observó una diferencia significativa. Esto sugiere que la alimentación de N promueve una mayor división celular con o sin la presencia de CO<sub>2</sub>.

Todas las concentraciones celulares máximas se observaron una vez que se había suspendido la alimentación en todos los tratamientos en los que se implementó cultivo por lote alimentado. En algunos casos, inclusive ya que la concentración de N en el medio se había agotado, por lo que el crecimiento superior no puede asignarse únicamente a la masa total de N ni a la concentración de N mantenida en el medio. Lo que confirma que los nutrientes (N y P) fueron almacenados en la biomasa y usados posteriormente para la división celular y el crecimiento del cultivo.

En condiciones naturales la concentración celular alcanza normalmente 1 x 10<sup>3</sup> cél/mL. Pero en cultivos masivos de microalgas la concentración celular alcanzar valores de hasta 1 x 10<sup>9</sup> cél/mL (Wang *et al.*, 2012). Gris *et al.* (2014) reportaron que *Scenedesmus obliquus* alcanzó concentraciones de 8 x 10<sup>7</sup> cél/mL cultivadas en 1000 μmol fotones/ (m<sup>2</sup> s), con tasas de crecimiento máximas a 150 μmol fotones/ (m<sup>2</sup> s). Por lo tanto, en este trabajo se alcanzó un cultivo masivo de

microalgas debido a que las concentraciones de  $10^6$  cél/mL son tres órdenes de magnitud mayores a lo reportado en condiciones naturales.

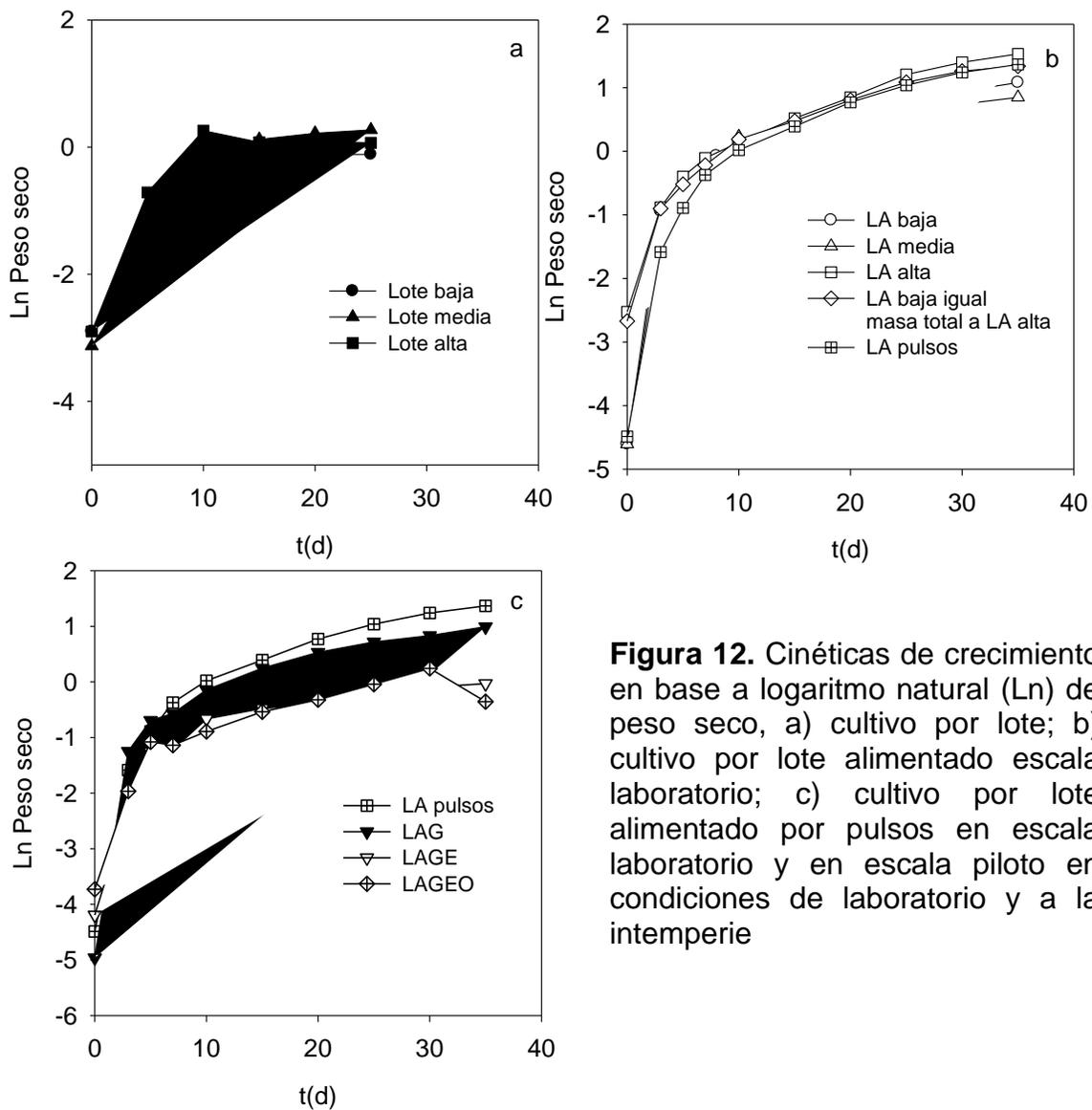
#### **6.3.4. Velocidad específica de crecimiento**

Las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) se evaluaron a partir de las cinéticas de crecimiento de logaritmo natural del peso seco (Fig. 12), y se resumen en las tablas 11 y 12.

En cultivo por lote, la  $\mu$  fue mayor al emplear una concentración superior de nitrógeno inicial en el medio de cultivo (Tabla 11). El crecimiento del cultivo fue exponencial entre los días 0 al 10 del cultivo (Fig. 12a).

En todos los tratamientos en lote alimentado se identificaron 3 velocidades específicas de crecimiento durante el periodo de cultivo (Tabla 12). En lote alimentado, la velocidad específica de crecimiento fue independiente de la concentración de N inicial, la concentración de N mantenida en el medio y la masa total de N.

Al igual que los tratamientos en escala laboratorio, los tratamientos en escala piloto, LAG en condiciones controladas, y a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO, presentaron 3 velocidades específicas de crecimiento durante el cultivo. El tratamiento LAGEO tuvo al final del cultivo un decrecimiento que pudo deberse a condiciones ambientales adversas. En la Tabla 12 puede observarse que aunque las velocidades específicas de crecimiento que se presentaron en los tratamientos LAGE y LAGEO tuvieron un periodo de tiempo diferente resultando finalmente en un menor crecimiento en base a peso seco.



**Figura 12.** Cinéticas de crecimiento en base a logaritmo natural (Ln) de peso seco, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie

**Tabla 11.** Velocidad específica de crecimiento en cultivo por lote de *Scenedesmus incrassatulus*.

Tratamiento	Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ )	Periodo (d)
Lote baja	0.266	0-10
Lote media	0.293	0-10
Lote alta	0.315	0-10

**Tabla 12.** Velocidades específica de crecimiento en cultivo por lote alimentado de *Scenedesmus incrassatulus*. En escala laboratorio, escala piloto, en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Escala	Tratamiento	Velocidades específicas de crecimiento ( $d^{-1}$ )					
		1 <sup>a</sup>	Periodo (d)	2 <sup>a</sup>	Periodo (d)	3 <sup>a</sup>	Periodo (d)
Laboratorio	LA baja	0.814	0-5	0.04	8-20	0.041	20-35
	LA media	0.772	0-5	0.044	5-20	0.04	20-35
	LA alta	0.434	0-5	0.077	5-25	0.032	25-35
	LA baja igual masa total a LA alta	0.442	0-5	0.076	5-25	0.025	25-35
	LA pulsos	0.586	0-7	0.076	7-25	0.032	25-35
Piloto	LAG	0.884	0-5	0.073	5-25	0.027	25-35
	LAGE	0.592	0-5	0.086	5-15	0.023	15-35
	LAGEO	0.534	0-5	0.058	7-30	-0.119	30-35

Debido a que la variación de la  $\mu$  no presentó relación con la alimentación de N, se piensa que el efecto de alimentar N al medio de cultivo hace que N deje de ser limitante del crecimiento y ayuda únicamente a prolongar el periodo de crecimiento, lo cual concuerda con lo expuesto por Choi *et al.* (2003), quienes afirman que la alimentación de nitrato causa que el N deje de ser limitante. En todos los tratamientos se presentó una  $\mu$  inicial alta que fue disminuyendo con respecto al tiempo, pero a medida que transcurre el tiempo de cultivo también aumenta la concentración celular provocando una disminución en la luz que puede penetrar al centro de reactor.

Se puede especular que a medida que aumenta la concentración celular la luz no puede atravesar todo el fotobiorreactor y es absorbida en las capas externas del mismo haciendo que la  $\mu$  disminuya. Lo que es evidente es que en cultivo por lote el crecimiento depende del factor N, mientras que en lote alimentado la velocidad específica de crecimiento es independiente del nitrógeno alimentado, aún a diferentes escalas de cultivo. Por lo anterior se piensa que la interacción de N con otros factores, como pueden ser la luz, carbono y/o fósforo pudieran explicar la velocidad de crecimiento en lote alimentado.

Comparando nuestro estudio con otros reportados en la literatura observamos que los valores de  $\mu$  del presente estudio se encuentran acorde a lo reportado para otras especies del género *Scenedesmus*. Por ejemplo, para *Scenedesmus almeriensis* se ha reportado una  $\mu$  0.63-1.8 d<sup>-1</sup> (Sánchez *et al.*, 2008a y b), para *Scenedesmus obliquus*  $\mu = 0.56$  d<sup>-1</sup> (Martínez *et al.*, 1999), para *Scenedesmus crassus* se reportó una  $\mu$  desde 0.39 hasta 0.83 d<sup>-1</sup> (Guerra *et al.*, 1981).

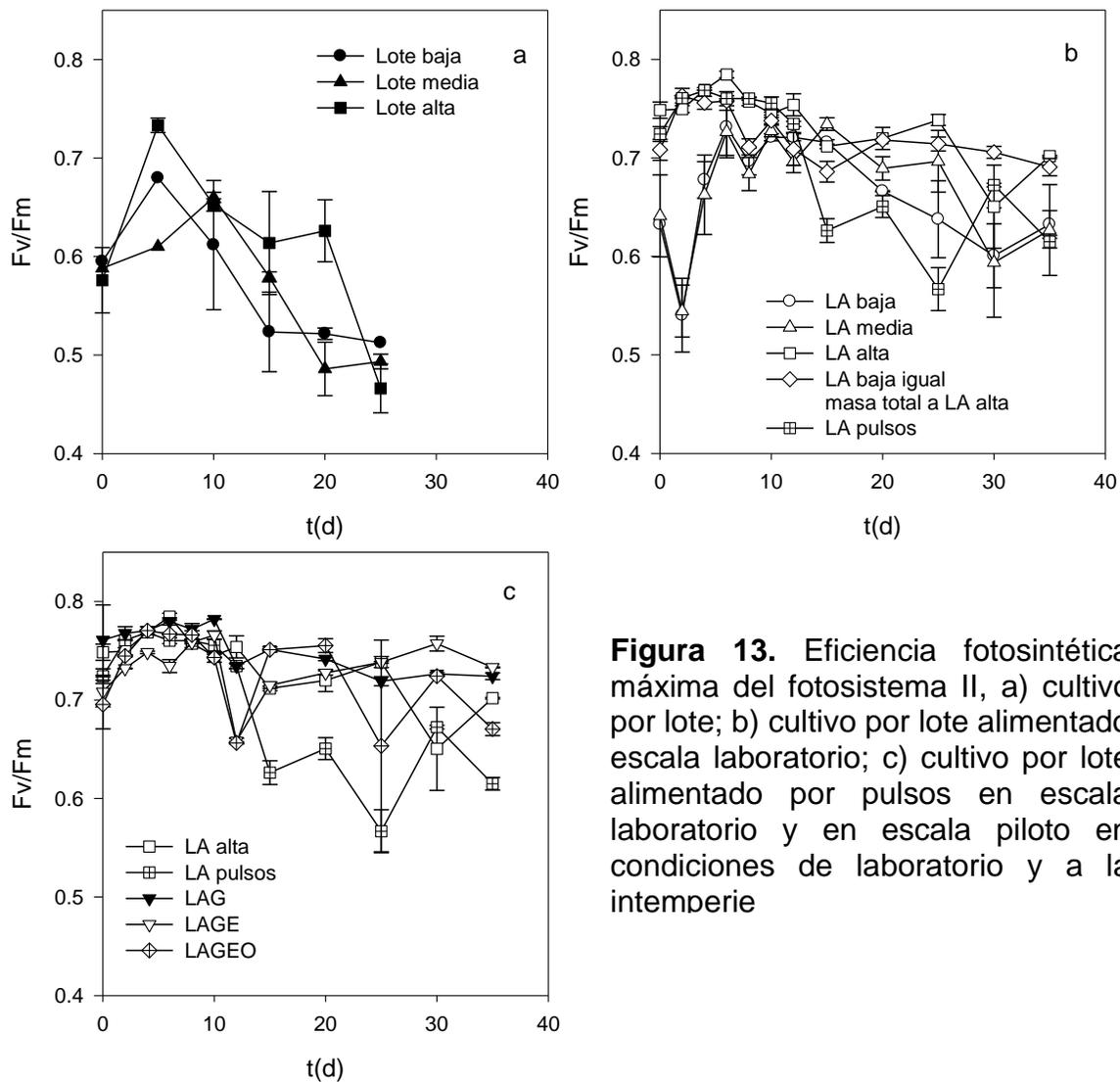
#### **6.4. Parámetros de fluorescencia**

La cuantificación de parámetros que den cuenta de la eficiencia del uso de la energía lumínica y de la cantidad de energía que se disipa en forma de calor fue importante, debido a que este proyecto se enfocó sobre la producción de luteína y a que se considera que los carotenoides primarios, como es el caso de la luteína, ayudan a la eficiente captación de la energía luminosa y a disipar el exceso de energía luminosa en forma de calor. De esta forma, se cuantificó la eficiencia fotosintética máxima (Fv/Fm), eficiencia fotosintética operacional (Fq'/Fm'), que establecen la proporción de energía luminosa que es utilizada para llevar a cabo la fotosíntesis, y el decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ) este último parámetro se relaciona con la disipación del exceso energía luminosa en forma de calor. Los cálculos de estos parámetros se realizaron de acuerdo a las fórmulas publicadas por Baker (2008).

##### **6.4.1. Eficiencia fotosintética máxima del fotosistema II (Fv/Fm)**

La comparación de los tratamientos es más sencilla cuando se comparan los valores de máxima Fv/Fm y el día cuando se presenta este valor máximo.

En cultivo por lote (Fig. 13a), se puede apreciar que al inicio del cultivo la Fv/Fm aumenta hasta alcanzar un valor máximo para después disminuir hacia el final del cultivo, en todos los casos. El valor de la Fv/Fm fue máxima al día 5 para los tratamientos Lote alta y Lote baja con un valor de 0.73 y 0.68, respectivamente. Mientras que en Lote media la Fv/Fm máxima tuvo un valor de 0.66 el día 10 de cultivo.



**Figura 13.** Eficiencia fotosintética máxima del fotosistema II, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie

Los valores de eficiencia fotosintética máxima ( $F_v/F_m$ ) al aplicar cultivo por lote alimentado fueron muy estables en el tiempo como se puede observar en la figura 13b. En cultivo por lote alimentado, tanto para LA media como para LA baja, la  $F_v/F_m$  se obtuvo un valor máximo de 0.73 al día 5 de cultivo, después de este tiempo y hasta el día 15 la  $F_v/F_m$  se mantuvo un rango entre 0.68 y 0.73.

El tratamiento LA alta presentó valores de  $F_v/F_m$  en un rango de entre 0.65 hasta 0.78, presentándose el valor máximo durante la alimentación y el valor mínimo hasta el final del cultivo. El mismo comportamiento mostró el tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta), pero con valores de  $F_v/F_m$  en un rango 0.68-

0.76, presentando este último tratamiento valores de Fv/Fm superiores a 0.7 durante el periodo de alimentación, una vez finalizada la alimentación se presenta el valor mínimo de 0.68 y al final del cultivo se obtuvo un valor de 0.70. En el caso de LA pulsos, la Fv/Fm presentó valores de 0.73-0.76, durante la alimentación del cultivo pero una vez interrumpida la alimentación al día 12 de cultivo la Fv/Fm comenzó a disminuir hasta llegar a un valor mínimo de 0.56 al día 25 de cultivo.

En lote alimentado en escala piloto (Fig. 13c) en condiciones controladas de laboratorio, tratamiento LAG, los valores de Fv/Fm tuvieron un intervalo de entre 0.72 a 0.78, siendo el comportamiento del tratamiento en escala piloto similar al de los tratamientos en escala laboratorio LA alta y LA pulsos. Cuando se implementó el cultivo en escala piloto a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO el cultivo se mantuvo en un rango de Fv/Fm entre 0.658 a 0.757, siendo este comportamiento nuevamente similar al de otros tratamientos en lote alimentado.

Esto nos indica que en lote alimentado los valores máximos de Fv/Fm se presentaron durante el periodo de alimentación de medio. El comportamiento observado de la Fv/Fm en este estudio concuerda con lo reportado por Qi *et al.* (2013) quienes concluyen que la sensibilidad de la Fv/Fm a las concentraciones de nutrientes puede depender de las capacidades de las diferentes cepas de microalgas de almacenar nutrientes.

Si se permite especular un poco, se puede inferir que la capacidad de la cepa *S. incrassatulus* de acumular N en su biomasa ayuda a que los valores de Fv/Fm en lote alimentado se mantengan altos a pesar de que el N en el medio ya se haya agotado

Es importante recordar que el valor teórico máximo de la eficiencia fotosintética reportado es de  $0.832 \pm 0.0004$  de acuerdo a lo publicado por Henriques (2009), el cual fue medido en plantas y microalgas clorofíceas. *Scenedesmus incrassatulus* es un alga clorofícea y cuenta un aparato fotosintético similar al de plantas superiores. Por lo tanto, este valor puede usarse como referencia para la microalga objeto de este estudio.

Normalmente, magnitudes cercanas a 0.83 son consideradas como de alta eficiencia fotosintética, por lo que puede afirmarse que la aplicación de lote alimentado promueve una alta eficiencia fotosintética y ayuda a conservarla inclusive después de que la alimentación ha sido suspendida, en diferentes escalas de cultivo e inclusive a la intemperie.

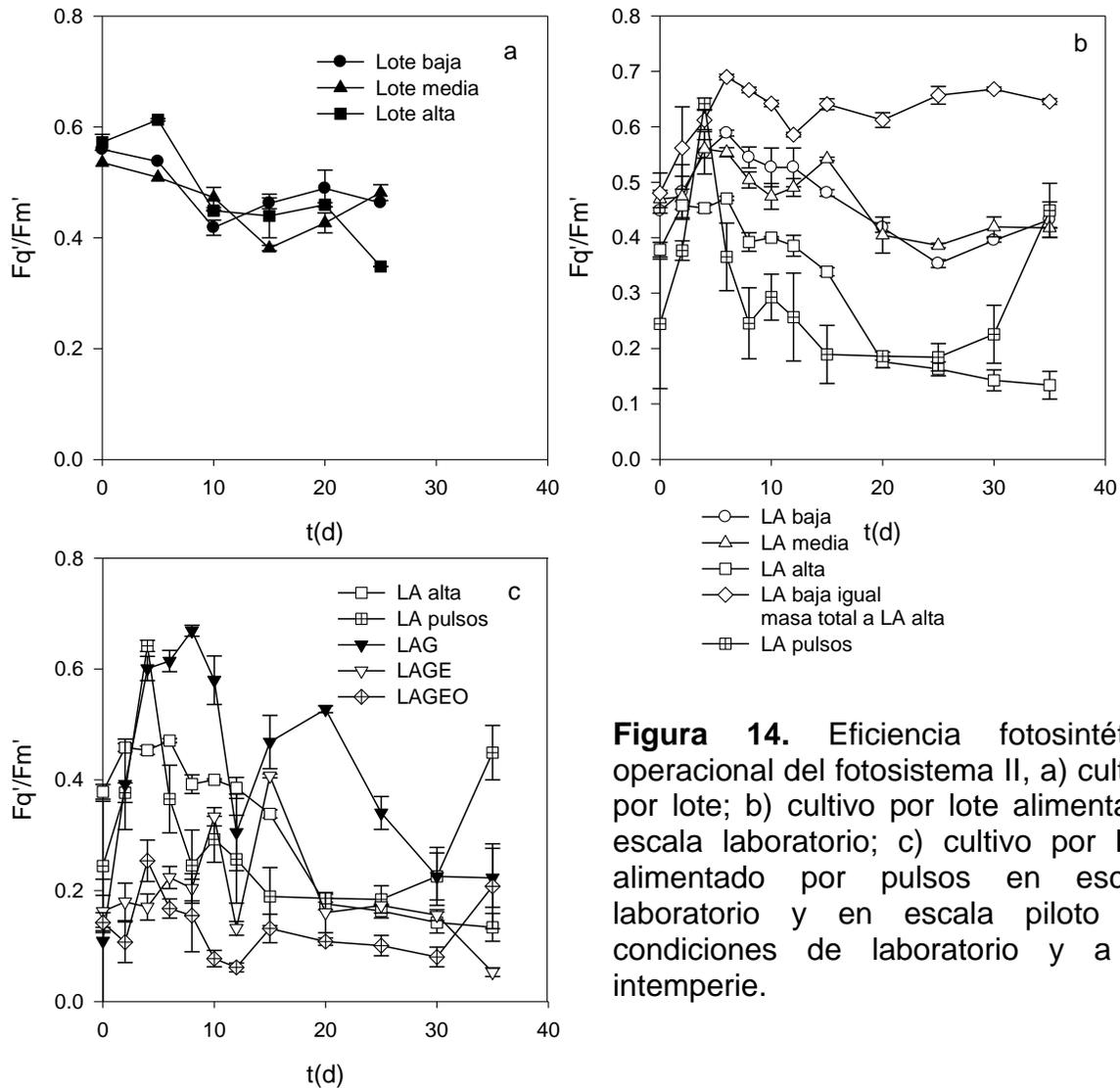
#### **6.4.2. Eficiencia fotosintética operacional del fotosistema II ( $Fq'/Fm'$ )**

La eficiencia fotosintética operacional ( $Fq'/Fm'$ ) nos indica la eficiencia con la que el PSII funciona bajo las condiciones de luz utilizadas en el cultivo.

En cultivo por lote, en el tratamiento Lote alta se observó la mayor y menor  $Fq'/Fm'$  con valores de 0.61 y 0.35 los días 5 y 25 del cultivo, respectivamente, mientras que en Lote media los valores de  $Fq'/Fm'$  variaron desde 0.53 al inicio del cultivo hasta un valor mínimo de 0.38 al día 15. En el caso de Lote baja los valores de  $Fq'/Fm'$  máximo y mínimo fueron de 0.56 y 0.42, respectivamente, presentándose el valor mínimo al día 10 del cultivo (Fig. 14a).

En la figura 14b observamos el comportamiento de la  $Fq'/Fm'$  en lote alimentado en escala laboratorio. En los tratamientos LA baja y LA media se puede observar que al inicio del cultivo de ambos tratamientos se presentó un valor de 0.45 de la  $Fq'/Fm'$ , aumentando rápidamente al día 6 de cultivo en LA baja a 0.58 y en LA media a 0.55, posteriormente los valores de  $Fq'/Fm'$  oscilan en ambos tratamientos entre 0.47-0.54 hasta el día 15, finalmente en ambos tratamientos la  $Fq'/Fm'$  disminuye a un valor final de 0.43. El valor de  $Fq'/Fm'$  de estos tratamientos se mantuvo entre 0.48-0.58 durante el periodo de alimentación del cultivo y al finalizar ésta la  $Fq'/Fm'$  disminuyó a 0.43.

De manera similar, en el tratamiento LA alta se observaron valores de  $Fq'/Fm'$  entre 0.38-0.47, durante el periodo inicial y de alimentación. Posterior a la suspensión de la alimentación la  $Fq'/Fm'$  comienza a disminuir hasta finalmente obtenerse una magnitud de 0.13 el día 35 de cultivo. Por lo que este tratamiento fue el que presentó las menores magnitudes de  $Fq'/Fm'$ , a pesar de haber tenido una  $Fq'/Fm'$  muy alta.



**Figura 14.** Eficiencia fotosintética operacional del fotosistema II, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

En el caso del tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se pudo apreciar que la  $Fq'/Fm'$  aumentó inicialmente desde un valor de 0.48 hasta 0.69, al día 6 de cultivo, posteriormente y hasta el final del cultivo la magnitud de  $Fq'/Fm'$  se mantuvo oscilando entre 0.58-0.66. Este fue el único tratamiento en el cuál la  $Fq'/Fm'$  no disminuyó después de suspender la alimentación de medio de cultivo.

En LA pulsos la  $Fq'/Fm'$  aumentó inicialmente desde un valor de 0.24 hasta 0.64, al día 4 de cultivo, posteriormente la  $Fq'/Fm'$  comienza a disminuir para ubicarse en un intervalo entre 0.20-0.24 durante los días 8-30, por lo que éste

tratamiento presentó un pico en la magnitud de  $Fq'/Fm'$  el día 4 de cultivo, es decir, durante la alimentación.

El cultivo en escala piloto en condiciones controladas (LAG) no fue la excepción a la tendencia mencionada presentando valores de  $Fq'/Fm'$  de 0.57 hasta 0.69 entre los días 4-10 (Fig. 14c). En cambio, en los tratamientos a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO la  $Fq'/Fm'$  permaneció en un valor bajo de 0.10 a 0.25, entre el inicio del cultivo al día 8 de cultivo, después del día 8 y hasta el día 20 se presentó un comportamiento oscilatorio entre valores de 0.07 a 0.40, y finalmente a partir del día 20 se estabilizó en un intervalo de entre 0.08 a 0.20.

La mayoría de los valores máximos de la  $Fq'/Fm'$  coinciden con la fase de crecimiento exponencial de los cultivos. Únicamente en Lote media y Lote baja el valor máximo fue el inicial. En los tratamientos en lote alimentado en escala laboratorio la máxima magnitud de la eficiencia fotosintética operacional ( $Fq'/Fm'$ ) se presentó entre los días 4-6 del cultivo, es decir, durante el periodo de alimentación.

Una alta magnitud de  $Fq'/Fm'$  significa que las células estaban aprovechando la luz que recibían de una manera más eficiente, se hace evidente al observar la figura 14c que en la escala piloto a la intemperie el cultivo presentó un menor aprovechamiento de la luz solar de manera operacional, esto posiblemente se debió a que las condiciones variables de iluminación que se presentan a la intemperie pueden ser excesivas durante algunos periodos del día. El principio fundamental para el diseño y operación de fotobiorreactores debe ser el uso eficiente de la energía luminosa. Una alta eficiencia fotosintética puede resultar en una mayor productividad y concentración de biomasa, pero el aumento de la eficiencia también implica un mayor costo debido a a energía necesaria para mezclar, enfriar y el costo de construcción de diseños no comunes de fotobiorreactores (Dogaris *et al.*, 2016).

Se ha reportado que la eficiencia fotosintética de *Scenedesmus obliquus* en diferentes condiciones de luz, desde 10 a 150  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ , fue casi constante. Sugiriendo que en diferentes condiciones de cultivo toda la luz que llega a los cultivos es aprovechada con la mayor eficiencia posible. Por otra parte, en

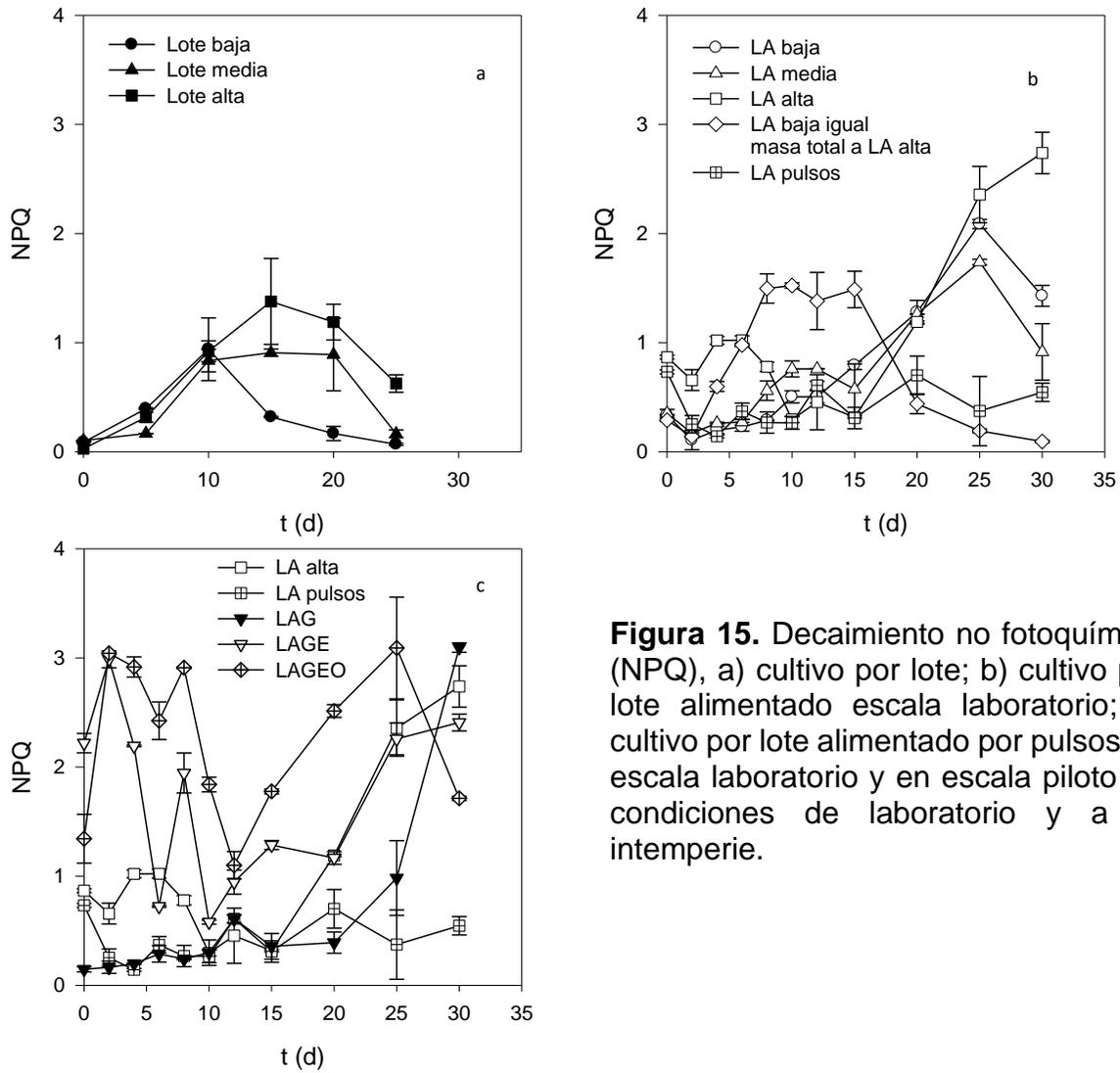
condiciones de estrés por luz, mayor a  $1000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ , las células son capaces de generar biomasa, pero la luz es usada con una eficiencia fotosintética operacional más baja (Gris *et al.*, 2014), como es el caso de este estudio.

#### **6.4.3. Non photochemical quenching (NPQ)**

La diferencia entre la magnitud de  $F_v/F_m$  y  $F_q'/F_m'$  indica que operacionalmente una parte de la energía luminosa absorbida tuvo que ser disipada, la cual se cuantificó como el decaimiento no fotoquímico de la fluorescencia (NPQ, non photochemical quenching en inglés). El NPQ es un parámetro de fluorescencia relacionado con la disipación en forma de calor de la energía luminosa absorbida por los fotosistemas.

En cultivo por lote (Fig. 15a) se registró un valor máximo para Lote media de 0.83 y para Lote baja de 0.93, al día 10 de cultivo. El valor máximo de NPQ para Lote alta fue de 1.37 al día 15 de cultivo. Cabe mencionar que no hubo diferencia significativa ( $p=0.05$ ) entre estos valores máximos de NPQ calculados. En la figura 15a se puede observar que el valor de NPQ disminuye hasta valores de 0.16 y 0.06, en los tratamientos Lote media y Lote, respectivamente. Esto último sugiere que el proceso y/o sistemas de disipación de energía en forma de calor son estabilizados por componentes nitrogenados, por lo tanto, cuando hay una concentración mayor de nitrógeno inicial, como es el caso de Lote alta, se presentan valores mayores de NPQ hacia el final del tiempo de cultivo debido a que los sistemas de disipación de energía pueden seguir funcionando durante un periodo de tiempo más prolongado.

Los datos del NPQ en lote alimentado se muestran en la figura 15b. En la misma puede observarse que el valor de NPQ se mantiene por debajo de 0.79 en los tratamientos LA baja y LA media antes del día 15 de cultivo, y después del día 15 el NPQ aumenta hasta un valor máximo de 2.08 y 1.73, respectivamente, para estos tratamientos.



**Figura 15.** Decaimiento no fotoquímico (NPQ), a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Desde el inicio del cultivo hasta el día 15, en el tratamiento LA alta, el NPQ muestra un comportamiento oscilatorio entre valores de 0.3-1. Posterior a este día, el NPQ aumenta hasta un valor de 2.73. Cabe resaltar que este fue el máximo valor de NPQ observado en todos los tratamientos en lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 15b).

En el tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se presentó un valor de NPQ de 0.14 el día 2 de cultivo, y empezó a aumentar hasta un valor de 1.5 al día 8 de cultivo, este valor se mantuvo estable hasta el día 15. El aumento en el NPQ y su estabilización coinciden en este tratamiento con el periodo de alimentación que fue del día 2 al 15 de cultivo. Una vez finalizada la alimentación,

el valor de NPQ comienza a disminuir hasta llegar a una magnitud de 0.09, lo cual confirma que el NPQ se encuentra relacionado con la cantidad de N en el medio, ya que al igual que en cultivo por lote baja el NPQ disminuye rápidamente después de que el N se agota del medio en este tratamiento, LA baja (de igual masa total de N a LA alta).

En el tratamiento LA pulsos, el NPQ inició con un valor de 0.73, disminuyendo a 0.14 al día 4, después de este tiempo y hasta el final del cultivo el valor de NPQ empezó a oscilar entre 0.26 a 0.7.

El comportamiento del parámetro NPQ de los tratamientos en escala piloto en condiciones controladas LAG, y a la intemperie en verano, LAGE, y en otoño, LAGEO, se puede observar en la figura 15c. Desde el inicio y hasta el día 20 se registraron valores inferiores a 0.5 de NPQ para el tratamiento en escala piloto en condiciones controladas, LAG. Los valores aumentan después del día 25 alcanzando un valor de 3 hacia el final del cultivo. Esto puede deberse a que en condiciones controladas la iluminación utilizada fue insuficiente como para que se requiriera mayor disipación de la energía luminosa.

El tratamiento a la intemperie en verano, LAGE, presentó un valor alto de NPQ desde 2 hasta 3 unidades, desde el inicio del cultivo hasta el día 4. Estos valores altos de NPQ al inicio del cultivo pueden ser atribuidos a la gran cantidad de luz que se presentó a la intemperie, la cual obviamente tuvo que ser disipada por medio de los mecanismos relacionados con el NPQ. Entre los días 6 al 15 se presentó un comportamiento oscilatorio, con valor mínimo 0.57 y un valor máximo de 1.94. Hacia el final del cultivo, la magnitud de NPQ comenzó a elevarse de nuevo hasta un valor de 2.40, siendo este comportamiento final del NPQ del tratamiento LAGE similar al de los tratamientos en condiciones controladas LAG y LA alta.

En el tratamiento a la intemperie en otoño LAGEO se registraron valores altos de NPQ, superiores a 1 y de hasta 3 unidades de NPQ. Estas altas magnitudes de NPQ pueden deberse a que en otoño el ángulo del sol en el cielo es más bajo por lo que al usarse un fotobiorreactor con disposición vertical el cultivo estuvo expuesto a una mayor incidencia de irradiación solar.

El NPQ sólo presenta una relación con el factor N a bajas concentraciones del mismo en el medio. Pero cuando la concentración de N en el medio es superior, como es el caso de los tratamientos en lote alimentado el NPQ es independiente de la concentración de N en el medio, lo cual queda confirmado con los datos presentados en el presente reporte. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado para la cepa *Scenedesmus* sp. (Pirastru *et al.*, 2012).

La disipación térmica del exceso de luz representa el principio básico de la fotoprotección en eucariotes. El NPQ se basa generalmente en procesos dependientes de xantofilas y otros procesos en las proteínas de las antenas reguladas por luz, las proteínas actúan como sensores del pH del lumen o de la luz y activan el NPQ a través de cambios conformacionales. En algas verdes, el NPQ es controlado por el cambio de pH, el cual depende de la acción de xantofilas y adicionalmente requiere de proteínas específicas de la antena como Lhcbm1 (Jhans *et al.*, 2012; Esteban y García-Plazaola, 2014). La luteína específicamente contribuye a la captación de luz transfiriendo la energía a la clorofila. La función más importante de la luteína es inactivar tripletes de clorofila, lo cual requiere una proximidad de luteína a la clorofila *a*. Sin embargo, en cualquier disipación térmica de clorofila se espera una disminución en el Fv/Fm, y en la ausencia o la disminución de Fv/Fm se puede pensar que la luteína se encuentra inactivando tripletes de clorofila y oxígeno singulete (Esteban y García-Plazaola, 2014).

Debido a que se ha reportado que el NPQ puede ser usado como un indicador de la acumulación de carotenoides (Pirastru *et al.*, 2012), se buscó alguna relación del NPQ con los pigmentos carotenoides específicos; sin embargo, no se encontró ninguna relación directa entre el NPQ y la concentración de luteína y/o de otros pigmentos, como neoxantina o violaxantina, del ciclo de las xantofilas.

A pesar de que algunas publicaciones mencionan que una de las funciones de los carotenoides es la de ayudar a disipar el exceso de energía absorbida en los fotosistemas para evitar daños en los mismos (DellaPenna, 1999), los carotenoides no son las únicas vías de disipación de la energía absorbida en exceso. Por lo que

a continuación se explicarán brevemente las vías alternas de disipación de energía y su relación con el nitrógeno y las proteínas.

#### **6.4.4. Rutas alternas al flujo de electrones, posible explicación sobre los resultados obtenidos de los parámetros de fluorescencia en lote alimentado**

Además de la ruta principal del flujo de electrones que se presenta en la fotosíntesis oxigénica, llamada flujo lineal de electrones o esquema Z, existen rutas alternas para la transferencia de electrones que interaccionan con la ruta principal.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden ser evidencia de la existencia de estas rutas auxiliares al flujo de electrones en la microalga *Scenedesmus incrassatulus* y deja claro que el proceso y/o sistemas de disipación de energía en forma de calor dependen de las condiciones ambientales, así como también de componentes proteicos.

Se piensa que cuando hay una mayor disponibilidad de nitrógeno, como es el caso del lote alimentado, el N es acumulado y después usado para sintetizar macromoléculas, en específico proteínas requeridas en la fotosíntesis (Hong *et al.*, 2011); algunas de estas moléculas participan en los sistemas de disipación de energía y en la captación de luz, estabilizando la eficiencia fotosintética. Todo el proceso finalmente ayuda a mejorar el aprovechamiento de la luz y a la disipación del exceso de energía (Bellafiore *et al.*, 2005; Iwai *et al.*, 2010). Algunos autores dan evidencia de la existencia de mecanismos proteicos para la disipación del exceso de energía de la fotosíntesis a los cuales han llamado rutas auxiliares al flujo de electrones (Jans *et al.*, 2008; Peltier *et al.*, 2010). Por ejemplo, en cultivos de *Haematococcus pluvialis* con limitación de nitrógeno, la cadena de transporte electrónico se ve seriamente dañada debido a la reducción significativa del complejo cytochrome b6/f (Zhang *et al.*, 2016). Por lo tanto, para prevenir la reducción de los fotosistemas se requiere suplementar una cantidad adecuada de nitrógeno.

Sin embargo, los valores de estos parámetros de fluorescencia junto con el crecimiento, pueden ser interpretados como un indicativo de limitación de luz, por lo que ha surgido la duda: ¿pueden las rutas alternas al flujo de electrones estar operando aún cuando haya una posible limitación de luz? Especialmente debido a

que se piensa que las rutas alternas ayudan a disipar el exceso de energía para proteger a los fotosistemas.

Se considera que las rutas alternas no sólo están presentes cuando hay un exceso de luz, sino que pueden ser una forma normal de operación de los fotosistemas. Endo y Asada (2008) argumentan que pueden estar en funcionamiento incluso cuando hay condiciones benignas de crecimiento. Por lo anterior, es conveniente realizar una breve discusión sobre las rutas alternas al flujo de electrones, que son el ciclo agua-agua, el flujo cíclico de electrones en el PSI, reacción de Mehler y procesos proteicos que participan en el NPQ. Esto ayudará al lector a entender mejor su participación en el NPQ.

Las rutas alternas al transporte de electrones, como el transporte cíclico de electrones en el Fotosistema I (PSI) y el ciclo agua-agua (Endo y Asada, 2008), tienen una función dual: actuar como un inductor del gradiente de protones en el PSII así como generar el ATP adicional requerido para el ciclo de fijación de CO<sub>2</sub> (Heber y Walker, 1992). El ciclo agua-agua tiene la función adicional de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los cloroplastos, ayudando a reducir las ROS como superóxido y peróxido de hidrógeno, que se producen durante el funcionamiento normal de la fotosíntesis (Endo y Asada, 2008).

Los ciclos agua-agua y el flujo cíclico de electrones en el PSI reducen al “pool” o reserva de plastoquinonas (PQ), disipando los electrones por lo que pueden participar directamente en el NPQ, ayudando a balancear la cantidad de energía disminuyendo la concentración NADPH y aumentando la de ATP. La producción ATP y NADPH por medio de la fotosíntesis es un proceso que requiere un balance adecuado de ATP/NADPH para que se pueda utilizar la energía de manera efectiva en la fijación de CO<sub>2</sub>. La relación ATP/NADPH requerida para el ciclo de Calvin es de 1.5 en plantas C<sub>3</sub> y microalgas (Endo y Asada, 2008).

Se hace evidente la función de estas rutas alternas si se considera que el flujo lineal de electrones no produce suficiente ATP para el ciclo de Calvin, resultando en una sobreproducción de NADPH (Endo y Asada, 2008).

Esta condición reductora (producción excesiva de NADPH), puede observarse a menudo cuando los organismos adaptados a baja luz o a la oscuridad son repentinamente expuestos a una cantidad de luz alta (Cornic *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2001), como puede ser el caso de las microalgas cuando se encuentran en un cultivo con una gran concentración celular, que es precisamente lo que sucede en lote alimentado en el presente estudio. Una producción adicional de ATP se realiza por medio del transporte cíclico de electrones o el ciclo agua-agua, ayudando a prevenir la reducción excesiva de los acarreadores de electrones.

El flujo cíclico de electrones es dependiente de Fd (ferredoxina) y mediado por una enzima llamada Fd-quinona reductasa (FQR). Mientras que el flujo cíclico dependiente de la NADPH es mediado por la enzima NADPH deshidrogenasa (NDH) (Endo y Asada, 2008). El ciclo agua-agua permite generar ATP, pero no NADPH, por lo que es similar al flujo cíclico de electrones alrededor del PSI. La FQR representa la ruta principal, mientras que la ruta NDH compensa la producción de ATP cuando la ruta de FQR no puede operar (Endo y Asada, 2008).

Sin embargo, deben considerarse algunas diferencias entre estas rutas, el “pool” o reserva de NADPH es más grande que el de Fd reducida en los cloroplastos, por lo que la ruta NDH tiene una mayor capacidad reductora cuando los fotosistemas exponen repentinamente a la luz alta. La NDH puede generar un gradiente de protones más grande que la FQR. La ruta FQR es efectiva para respuestas cortas mientras que la ruta NDH para respuestas de larga duración (Endo y Asada, 2008).

Ambos ciclos, el agua-agua y el flujo cíclico de electrones en el PSI, generan un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal y producen ATP. En el ciclo agua-agua, los electrones del PSII son utilizados para la reducción de oxígeno a agua y no son almacenados como equivalentes reductores en la forma de NADPH. Por lo tanto, el rendimiento cuántico para la producción de ATP es menor a la del flujo cíclico de electrones en el PSI. En otras palabras, el ciclo agua-agua puede disipar un exceso de electrones generados en el PSII y disipar de forma efectiva el

exceso de energía fotónica, en comparación con el flujo cíclico de electrones en el PSI (Endo y Asada, 2008).

Aunque el flujo cíclico de electrones en el PSI y el ciclo agua-agua pueden compartir funciones fisiológicas similares, es importante hacer notar que el primero conserva la energía evitando que se absorba más energía, mientras que el segundo es un sistema de disipación de energía (Endo y Asada, 2008).

Otra función primaria del ciclo agua-agua es desactivar de manera rápida y efectiva a las ROS (por ejemplo ion superóxido y peróxido de hidrógeno) para evitar su interacción con moléculas que participan en el ciclo de Calvin. Se estima que aunque el flujo de electrones sea bajo, la generación de ROS por si misma pudiera inhibir la fijación de CO<sub>2</sub> por la inactivación de enzimas del ciclo de Calvin (Asada, 1999). Mientras el ciclo agua-agua funcione adecuadamente, y pocas ROS puedan liberarse, no se producirán daños críticos en los fotosistemas y enzimas del ciclo de Calvin, además de que la energía en exceso podrá ser disipada de manera efectiva (Endo y Asada, 2008).

El que el ciclo agua-agua esté presente inclusive en cianobacterias, sugiere que es muy efectivo para desactivar especies reactivas de oxígeno (ROS) y que fue adquirido por los organismos fotosintéticos a muy bajas concentraciones de oxígeno atmosférico, hace 3 000 millones de años cuando las cianobacteras evolucionaron. Sin este sistema, las cianobacterias no hubieran podido sobrevivir debido a que las células hubieran sufrido daños provocados por las ROS que ellas mismas producían (Yamamoto *et al.*, 1999; Asada 2000; Endo y Asada, 2008), ya que algunas enzimas del ciclo de Calvin, como fructosa-1,6-bifosfatasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, ribulosa-5-fosfato quinasa y pseudoheptulosa-1, 7-bifosfatasa son inactivadas por peróxido de hidrógeno, una molécula que forma parte de las ROS, que provoca la oxidación de los grupos sulfidrilos funcionales de estas enzimas (Kaiser, 1976).

Aunque aún se debate la cantidad de ATP producida por el ciclo agua-agua (Osmond y Grace, 1995; Asada, 1999, 2000; Heber, 2002), es claro que el ciclo es indispensable para la eliminación efectiva de ROS, lo que ayuda a proteger a las

enzimas del ciclo de Calvin susceptibles a daños por los mismos y proteger los fotosistemas de la fotoinhibición (Endo y Asada, 2008). Cuando el ciclo agua-agua no puede operar en *Arabidopsis*, por la inactivación de superóxido dismutasa una enzima clave de este ciclo, el crecimiento y desarrollo se ven retrasados, además de que esas plantas muestran síntomas de photoinhibición tales como baja capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> y bajo contenido de clorofila, inclusive en condiciones benignas de crecimiento (Rizhsky *et al.*, 2003). Estas observaciones indican que el ciclo agua-agua es esencial para proteger de la fotoinhibición incluso bajo condiciones normales de crecimiento donde no hay estrés por exceso de luz (Endo y Asada, 2008).

Otra ruta auxiliar al flujo de electrones involucra la fotoreducción de oxígeno por medio de los aceptores de electrones del PSI, proceso también llamado reacción de Mehler (Mehler, 1951), en honor a su descubridor. La existencia de esta ruta se confirmó *in vivo* en microalgas del género *Scenedesmus* (Radmer y Kok, 1976); sin embargo, al llevarse a cabo esta ruta en el PSI no puede participar directamente en el NPQ, ya que sólo se presenta cuando el sistema de fijación CO<sub>2</sub> no funciona debido a la falta de ATP (Radmer y Kok, 1976).

Recientemente, Iwai *et al.*, (2010) han demostrado la existencia de otro proceso proteico que puede participar en el NPQ. Durante el proceso de fotosíntesis bajo condiciones de luz cambiantes (que se presentan a la intemperie o debido al cambio en la concentración celular), es importante un balance de energía entre los dos fotosistemas, el “pool” o reserva de plastoquinonas (PQ), un acarreador de electrones entre PSII y PSI, “monitorea” las condiciones cambiantes de cantidad y calidad (longitud de onda) de luz, activando una enzima kinasa que fosforila a las proteínas que conforman el complejo antena captador de luz del PSII (LHCII), formando fosfo-LHCII, la fosforilación del LHCII induce la separación del mismo del PSII, disminuyendo el nivel de excitación del PSII. Los LHCII desasociados forman agregados, los cuales pueden participar en el proceso de disipación de energía, eliminando de esta forma los efectos dañinos del exceso de luz. Algunas moléculas de LHCII se incorporan al PSI completando lo que se conoce como estados de transición. De la misma forma las moléculas de LHCII pueden disociarse del PSI,

formar agregados y regresar al PSII. Todo el proceso finalmente ayuda a mejorar el aprovechamiento de la luz y la disipación del exceso de energía (Bellafiore *et al.*, 2005; Iwai *et al.*, 2010).

Por lo tanto, existen diversas rutas para la reducción de plastoquinona, el flujo cíclico de electrones en el PSI y el ciclo agua-agua, dependientes de ferredoxina y por NADPH, e indirectamente la formación de complejos fosfo-LHCII que al incorporarse al PSI ayudarían a que se llevaran a cabo los primeros dos ciclos (Endo y Asada, 2008; Iwai *et al.*, 2010; Peltier *et al.*, 2010). A la luz de las nuevas evidencias experimentales, es claro que las rutas alternas de electrones ayudan a evitar un desbalance de producción ATP/NADPH debido a la insuficiente producción de ATP, inactivar ROS que se producen durante el funcionamiento normal de la fotosíntesis, a disipar la energía en exceso y en conjunto todas estas funciones ayudan a aumentar la eficiencia fotosintética.

Todas estas evidencias experimentales de diversos estudios que se han descrito apoyan la idea de la existencia de estas rutas auxiliares al flujo de electrones en la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. Dejando en claro que el proceso y/o sistemas de disipación de energía en forma de calor dependen también de componentes proteicos, enzimas, flujos cíclicos de electrones y la transición de los componentes de los LHC. También se piensa que las células de *S. incrassatulus* pueden usar la reserva interna de N para sintetizar componentes macromoleculares, incluso después de que el nitrato en el medio se ha agotado, esto último se encuentra en concordancia con lo reportado por Hong *et al.* (2011).

El llamado "modelo QA" brinda explicaciones sobre los comportamientos observados de NPQ y fluorescencia, y en este modelo se basan muchas de las discusiones sobre los datos de fluorescencia. Pero los autores Stirbet y Govindjee (2012) así como Schansker *et al.*, (2013), han realizado revisiones muy extensas sobre evidencias que dan cuenta de que el modelo QA es insuficiente para explicar la complejidad de las reacciones de la fotosíntesis y sugieren que el modelo QA debe de ser reevaluado debido a que: 1) las suposiciones básicas del mismo no son válidas o 2) existen factores adicionales deben tomarse en cuenta. Schansker *et al.*,

(2013) inclusive mencionan que observaciones experimentales inconsistentes con el modelo QA existen desde hace muchos años pero que las interpretaciones alternativas de estos no han ganado popularidad debido a que se carece de mecanismos que expliquen sin lugar a dudas que las explicaciones alternativas son las que dan cuenta de los comportamientos observados. Stirbet y Govindjee (2012) también aceptan que existen observaciones experimentales inconsistentes con el modelo QA, pero desde una perspectiva personal mencionan que el modelo QA es la teoría más creíble.

El autor de la presente tesis piensa que las explicaciones alternativas que involucran una participación más activa de los componentes proteicos de los fotosistemas (Schansker *et al.*, 2013) así como las complejidades estructurales de los mismos (Pagliano *et al.*, 2013), aunado a las rutas alternas al flujo de electrones como el ciclo agua-agua, el flujo cíclico de electrones en el PSI y procesos proteicos que participan en el NPQ son las más adecuadas para explicar los resultados obtenidos en cultivo por lote alimentado de este estudio.

#### **6.4.5. Índice de desempeño fotosintético (PI)**

La eficiencia fotosintética y el NPQ no son los únicos parámetros de fluorescencia que pueden ser usados para monitorear el funcionamiento de los fotosistemas. Durante el estudio se decidió que sería conveniente considerar el comportamiento de otros parámetros que pudieran evaluar el proceso fotosintético en su conjunto, como el índice del desempeño fotosintético (PI).

De acuerdo a reportes de Kalaji *et al.* (2012), el índice de desempeño del fotosistema II (PI) es el único parámetro considerado como buen indicador de efectos de los cambios de luz en la actividad del fotosistema II, inmediatamente después de la aplicación de algún estímulo (después de 1 día). En contraste, la máxima eficiencia del PSII ( $F_v/F_m$ ) y los parámetros fenomenológicos relacionados a la absorción de energía, atrapamiento y transporte electrónico calculados a partir de la “prueba-JIP” en base a área transversal (CS) sufren cambios sólo después de 7 días de la aplicación del estímulo. Por lo que Kalaji *et al.* (2012) no recomiendan el uso de la  $F_v/F_m$  como un indicador de la detección temprana de estrés por luz

debido a que los parámetros que caracterizan la actividad del fotosistema II cambian de diferentes maneras.

El PI evalúa el funcionamiento de los sistemas fotosintéticos de manera global. El PI es un parámetro compuesto por tres términos y se define mediante la siguiente formula:

$$PI_{ABS} = \left( \frac{\gamma}{1 - \gamma} \right) \left( \frac{\varphi P_0}{1 - \varphi P_0} \right) \left( \frac{\psi_0}{1 - \psi_0} \right)$$

El primer término representa la fuerza generada por los centros de reacción activos, o en otras palabras, la fuerza que genera el centro de reacción con respecto a la energía absorbida por la clorofila presente en la antena.

$$\frac{\gamma}{1 - \gamma} = \frac{RC}{ABS} = \left[ \left( \frac{F_{2ms} - F_{50\mu s}}{F_M - F_{50\mu s}} \right) \left( \frac{1}{\frac{dV}{dt}} \right) \right] \left( \frac{F_V}{F_M} \right) = \frac{Chl_{RC}}{Chl_{antena}}$$

El segundo término representa la contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria. El parámetro  $F_V/F_0$  es la eficiencia del complejo liberador de oxígeno en el lado donador del PSII (Kalaji *et al.*, 2012)

$$\varphi P_0 = \frac{F_V}{F_M} = \frac{TR_0}{ABS}$$

$$\frac{\varphi P_0}{1 - \varphi P_0} = \frac{F_V}{F_0}$$

El tercer término se encuentra relacionado a la fuerza de las reacciones de la oscuridad, o reacciones que suceden después de  $Q_A^-$  que provocan la reoxidación de  $Q_A^-$ , incluyendo el ciclo de Calvin.

$$\frac{\psi_0}{1 - \psi_0} = \frac{F_M - F_{2ms}}{F_{2ms} - F_{50\mu s}} = \frac{ET_0}{TR_0 - ET_0}$$

Donde en las anteriores fórmulas se describen los diferentes términos

RC=centro de reacción.

ABS=eficiencia cuántica de absorción de luz para llevar a cabo la fotoquímica primaria y reducir  $Q_A$ .

RC/ABS = relación de clorofilas del centro de reacción con respecto a la cantidad de clorofila de la antena del PSII.

$F_{50\mu s} = F_0$ , fluorescencia mínima de los fotosistemas adaptados a la oscuridad.

$F_{2ms}$  = es la fluorescencia en el tiempo "J" de la cinética de fluorescencia, la cual se relaciona con el estado de oxidación de  $Q_A$  (quinona A).

$F_{300\mu s}$  = fluorescencia a los 300 $\mu s$ , se usa para calcular la pendiente inicial de la cinética de fluorescencia (MO).

$F_M$  = Fluorescencia máxima de los fotosistemas adaptados a la oscuridad.

$F_V$  = Fluorescencia variable, es la diferencia  $F_M - F_0$  de los fotosistemas adaptados a la oscuridad.

$\gamma$  = relación de clorofilas del centro de reacción con respecto a la cantidad total de clorofila del PSII durante el tiempo de 50 $\mu s$  a 1s.

$\phi P_0$  = máximo rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria.

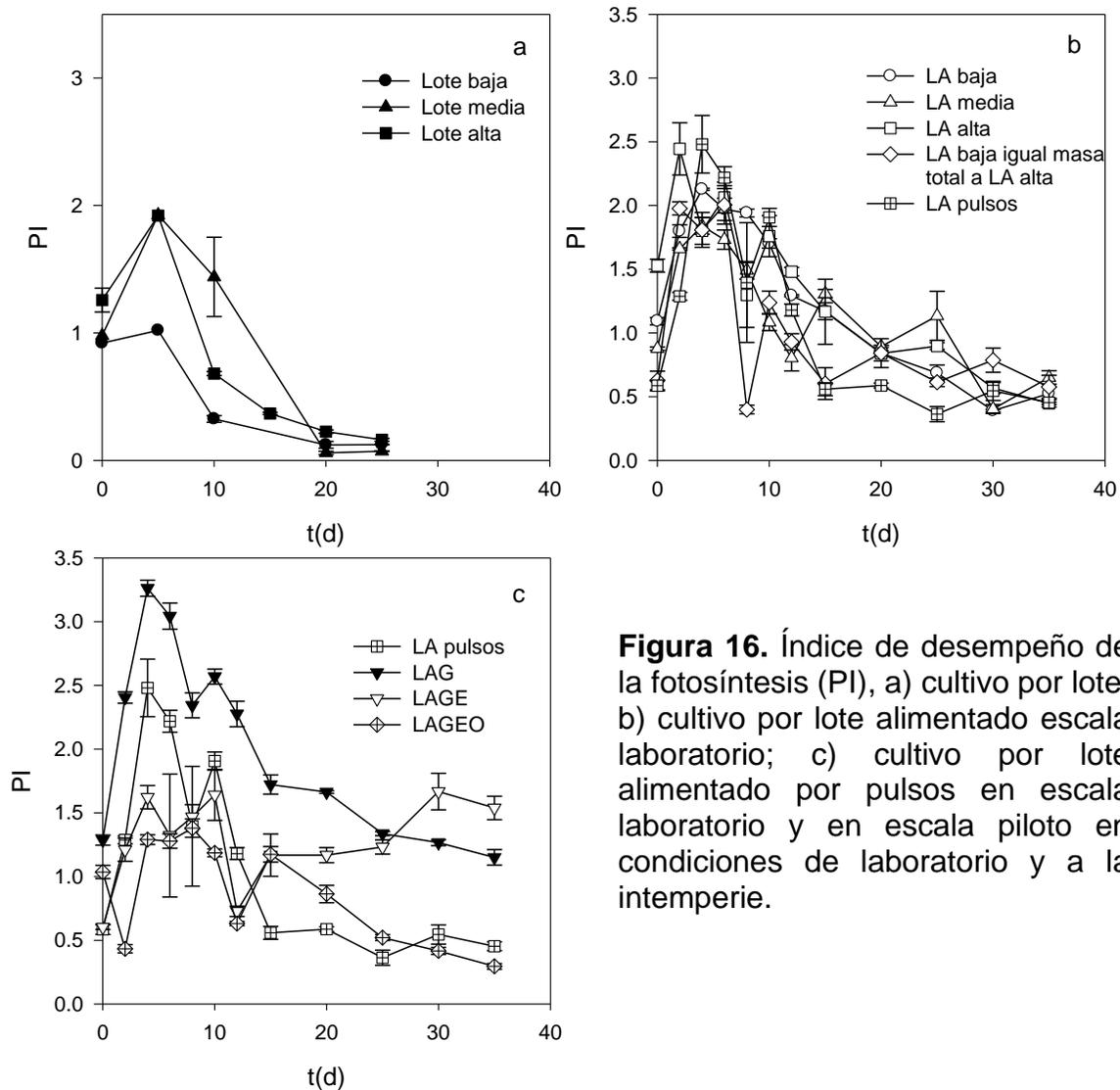
$\Psi_0 = ET_0/TR_0$ , eficiencia con la cual un excitón atrapado puede mover un electrón después de  $Q_A$  en la cadena transportadora de electrones. (Strasser *et al.*, 2004; Boureima *et al.*, 2012).

Habiendo definido lo que representa el índice de desempeño fotosintético, podemos pasar a los resultados y discusión del mismo. En cultivo por lote (Fig. 16a), se puede observar que en todos los tratamientos hubo un PI máximo al día 5 de cultivo, es decir, cuando había crecimiento exponencial de los cultivos. Los valores máximos de PI fueron 1.02 para Lote baja y 1.92 para Lote media y Lote alta.

De los datos de PI de los tratamientos en lote alimentado realizados en condiciones controladas en escala laboratorio (Fig. 16b), se puede observar que también presentan un valor máximo de PI al inicio del cultivo. En todos los tratamientos en lote alimentado el valor de PI máximo coincidió con el periodo de alimentación. Los tratamientos con mayor concentración inicial y mayor concentración mantenida de N mediante la alimentación, LA alta y LA pulsos, fueron los que presentaron valores máximos de PI de 2.4, el cual fue posteriormente

disminuyendo para alcanzar al final del cultivo un valor de 0.45 en ambos tratamientos.

El tratamiento en escala piloto en condiciones controladas LAG (Fig. 16c), presentó un valor máximo superior en casi una unidad con respecto a los tratamientos en escala laboratorio. La magnitud de PI máxima 3.26 se registró al día 4 de cultivo en el tratamiento LAG. Después este valor fue disminuyendo hasta un valor de 1.15 al final del cultivo.



**Figura 16.** Índice de desempeño de la fotosíntesis (PI), a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

En el tratamiento la intemperie en otoño, LAGEO, también se observó un comportamiento similar pero con magnitudes menores. El PI aumentó hasta 1.29,

después se presentó un comportamiento oscilatorio con valores de PI entre 0.63-1.27, finalmente el valor de PI disminuyó hasta un valor de hasta 0.29. En cambio, el tratamiento realizado a la intemperie en escala piloto en verano, LAGE, presentó un comportamiento diferente, oscilatorio entre los días 0 al 15 de cultivo con valores entre 0.6 hasta 1.64 y a diferencia de otros tratamientos el PI no disminuyó hacia el final del cultivo, al contrario, aumentó hacia el día final con un valor de 1.53.

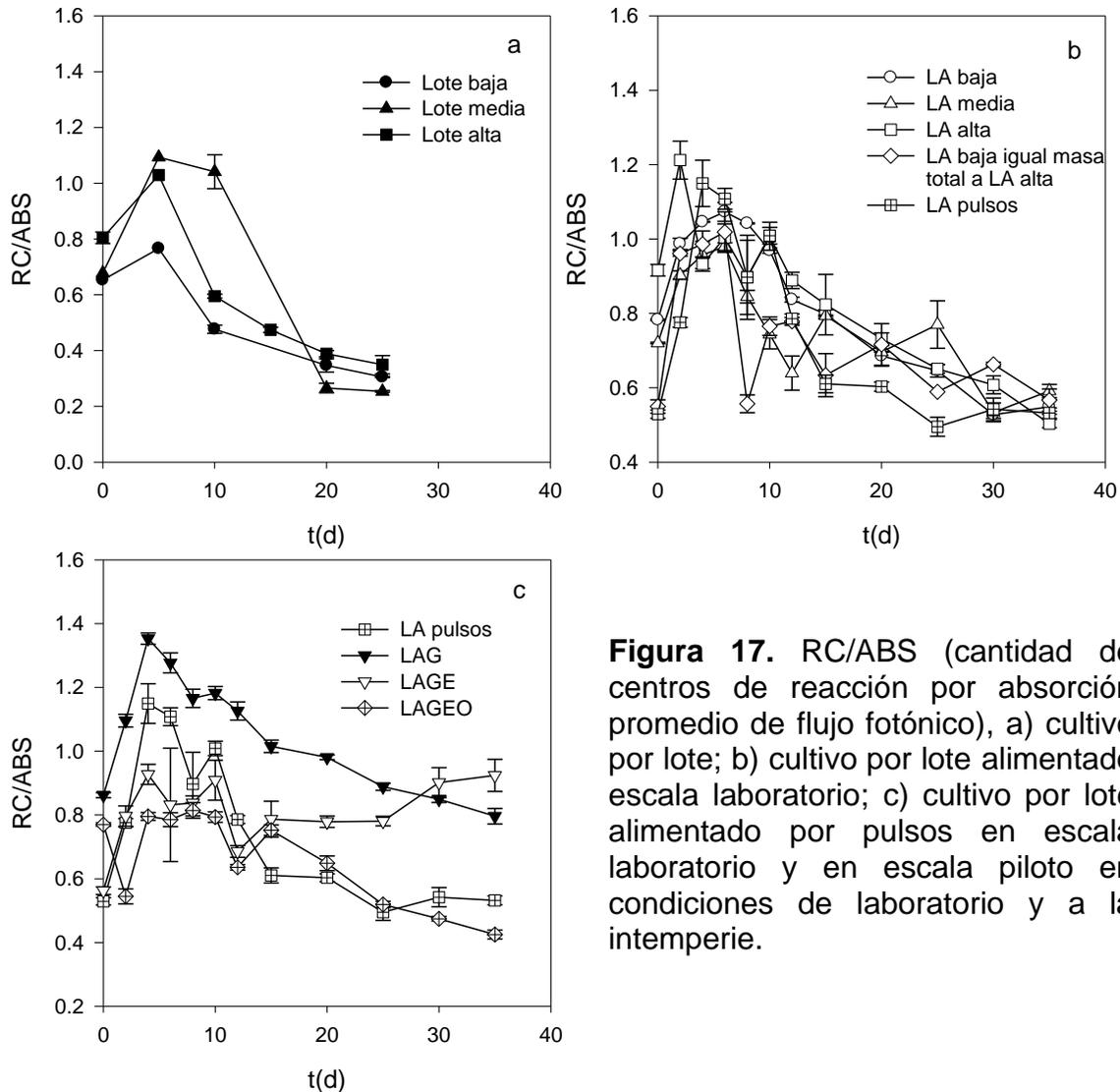
Se pudo observar que el desempeño fotosintético fue mayor al emplear lote alimentado. También podemos inferir que en cultivo a la intemperie los sistemas fotosintéticos se encontraban trabajando sin fotoinhibición debido a que los valores de PI de los cultivos realizados a la intemperie se encuentran entre los registrados para cultivo por lote y lotes alimentados realizados en condiciones controladas. Además, se piensa que este parámetro no disminuyó hacia el final del cultivo en este último tratamiento debido al crecimiento lento del cultivo, las condiciones de luz en verano y la presencia de exceso nutrientes en el medio de cultivo de este tratamiento.

#### **6.4.5.1. Tamaño relativo de la antena que sirve a cada centro de reacción (RC/ABS)**

El primer término del índice de desempeño fotosintético fue analizado con mayor detenimiento. El RC/ABS puede ser también interpretado como el tamaño relativo de las antenas que sirven a los fotosistemas con respecto al tamaño de los centros de reacción. Debido a que los pigmentos carotenoides, incluida la luteína, se encuentran formando parte de los complejos antena de los fotosistemas, resulta útil discutir este término (Fig. 17), el cual también representa la cantidad de centros de reacción por absorción promedio de flujo fotónico. También puede interpretarse como una relación de las moléculas de clorofila del centro de reacción con respecto a la clorofila presente en la antena. Un decremento en RC/ABS implica una disminución en el tamaño de la antena que sirve a cada centro de reacción (Mathur *et al.*, 2011).

El valor de RC/ABS, al igual que el PI, presenta un valor máximo al inicio del cultivo y después una disminución. Los resultados obtenidos tanto en lote (Fig. 17a)

como en lote alimentado (Fig. 17b y c) indican que los tamaños relativos de las antenas de los fotosistemas no son constantes en el tiempo.



**Figura 17.** RC/ABS (cantidad de centros de reacción por absorción promedio de flujo fotónico), a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Los valores máximos en cultivo por lote fueron 0.76 para Lote baja, 1.09 para Lote media y 1.02 en Lote alta, al día 5 de cultivo. Los valores mínimos se obtuvieron al final de los cultivos con valores entre 0.25 y 0.34. Al expresar lo anterior como porcentaje, podría decirse que el tamaño de la antena al final del cultivo es de entre 25-30% del tamaño máximo de antena alcanzado, y es menor cuando se usa menor concentración inicial de N en cultivo por lote.

En cultivo por lote alimentado se obtuvieron valores máximos de RC/ABS de 1.07 para LA baja, 0.98 para LA media y 1.21 para LA alta. En el tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se obtuvo un máximo de 1.01, lo cual es muy similar en magnitud al de LA baja. En LA pulsos el valor máximo fue de 1.14. En lote alimentado el tamaño final de la antena fue de aproximadamente 40-60% del tamaño máximo de antena, es decir, en lote alimentado el tamaño de la antena disminuyó en menor proporción que en cultivo por lote.

Los tratamientos en escala piloto en condiciones controladas LAG, y a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO, tuvieron valores máximos de RC/ABS de 1.35, 0.92 y 0.81. Este comportamiento de aumento inicial y posterior disminución se presenta en todos los tratamientos excepto en el cultivo a la intemperie en verano, LAGE, que fue diferente al de los demás tratamientos, como se puede observar en la figura 17c. En el tratamiento LAGE RC/ABS no disminuyó hacia el final del cultivo presentando un valor de 0.92, mientras que los demás tratamientos en lote alimentado presentaron valores finales entre 0.5-0.8. Este comportamiento se ha adjudicado al hecho de que en LAGE al final cultivo no se había agotado el N en el medio.

Estos resultados indican que las células de *S. incrassatus* ajustan el tamaño de sus antenas dependiendo de la cantidad de N en el medio. Se puede suponer que este ajuste en el tamaño es posiblemente con la finalidad de mejorar el aprovechamiento de la luz y evitar daño a los fotosistemas por exceso de luz, favoreciendo tamaños grandes de antena al inicio del cultivo cuando el mismo es menos denso y cuando hay más disponibilidad de nitrógeno.

Es importante mencionar que una antena más grande es capaz de disipar una mayor cantidad de energía que una antena pequeña (Torzillo *et al.*, 2003). Por lo tanto, al inicio de cultivo, cuando todavía no hay una alta densidad celular, se presenta una antena grande para favorecer la disipación de la energía luminosa en exceso, a la par que se favorece el crecimiento. El hecho de que se presenten tamaños relativos de antena más grandes cuando hay nitrógeno en el medio refleja

la dependencia que tiene el proceso de captación de luz con las proteínas que lo conforman, que a su vez requieren N para su síntesis.

Sin embargo, no hubo alguna relación directa entre el tamaño relativo de la antena y pigmentos específicos, como la luteína. Por lo tanto, no se recomienda el uso de este parámetro para monitorear la concentración y contenido de luteína.

#### **6.4.5.2. Contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria del PSII ( $F_v/F_0$ )**

El segundo factor que compone al PI se conoce como la contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria  $F_v/F_0$ . El parámetro  $F_v/F_0$  representa la eficiencia del complejo liberador de oxígeno en el lado donador del fotosistema II (Kalaji *et al.*, 2012).

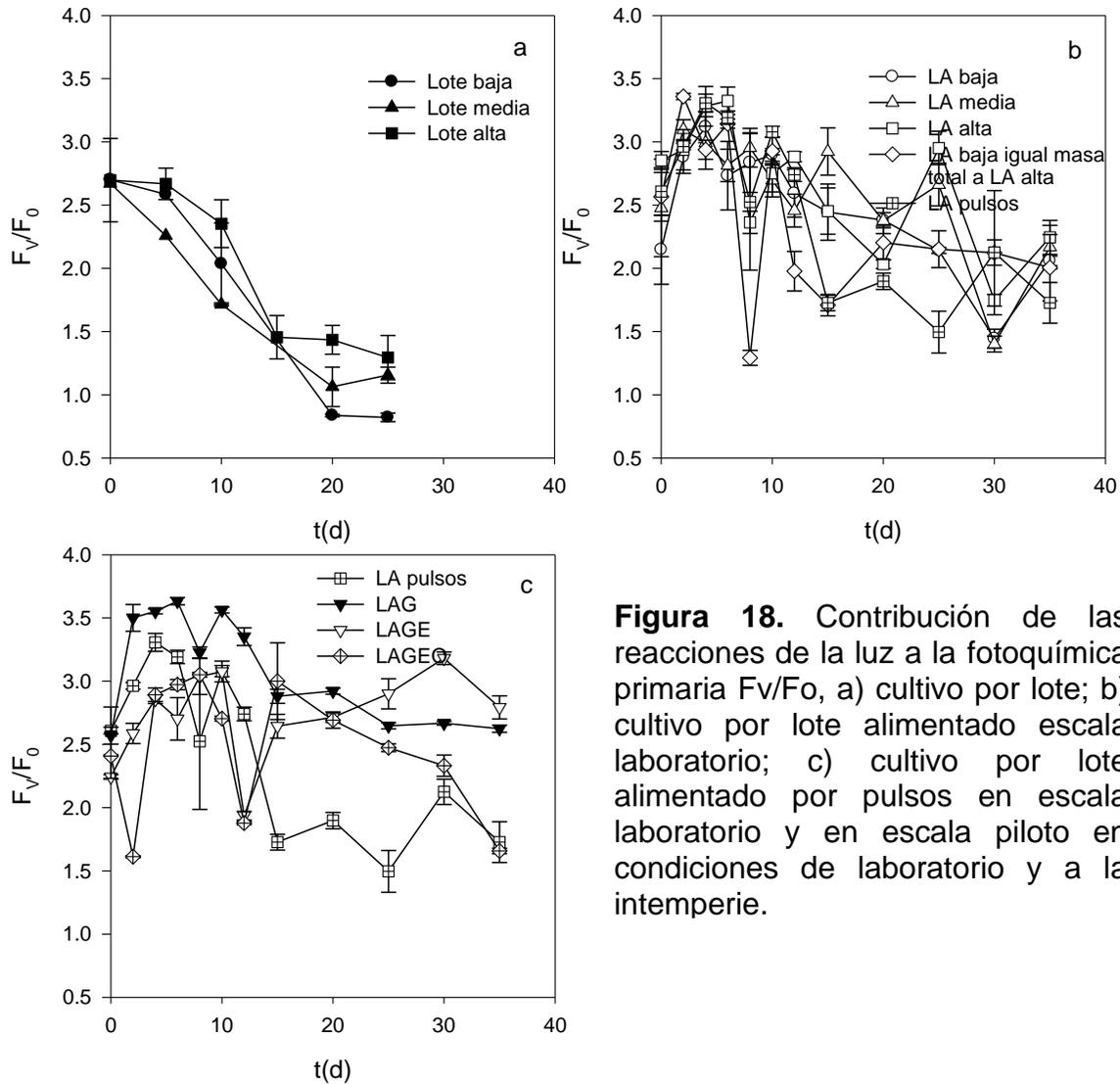
Los resultados de este parámetro se presentan en la figura 18. En cultivo por lote (Fig. 18a) se observó que la  $F_v/F_0$  fue disminuyendo progresivamente desde un valor inicial de 2.7 hasta un valor final mínimo de 0.8, 1.15 y 1.3, para los tratamientos Lote baja, Lote media y Lote alta, respectivamente. Como se puede ver el valor final fue mayor al emplearse una mayor concentración inicial de N.

En cultivo por lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 18b), el comportamiento de  $F_v/F_0$  fue oscilatorio con valores entre 1.4-3.32. Mientras que en lote alimentado en escala piloto en condiciones controladas LAG (Fig. 18c) se obtuvo el máximo valor de 3.63, este valor fue superior al de todos los demás tratamientos, y nos indica que en el tratamiento LAG el complejo liberador de oxígeno estaba muy activo. Al igual que en la escala laboratorio, en la escala piloto hubo un comportamiento oscilatorio con valores de entre 1.61-3.63.

En los tratamientos en escala piloto a la intemperie en verano, LAGE, y en otoño, LAGEO, el  $F_v/F_0$  no disminuyó al final del cultivo, posiblemente debido a que en estos tratamientos la concentración de N no se había agotado, o tardó más en agotarse el N.

En general, los valores de  $F_v/F_0$  en lote alimentado fueron superiores a los de cultivo por lote, por lo que puede decirse que el lote alimentado favorece una mayor

eficiencia del complejo liberador de oxígeno del fotosistema II. También se infiere que la eficiencia del complejo liberador de oxígeno se mantiene al escalar el cultivo.

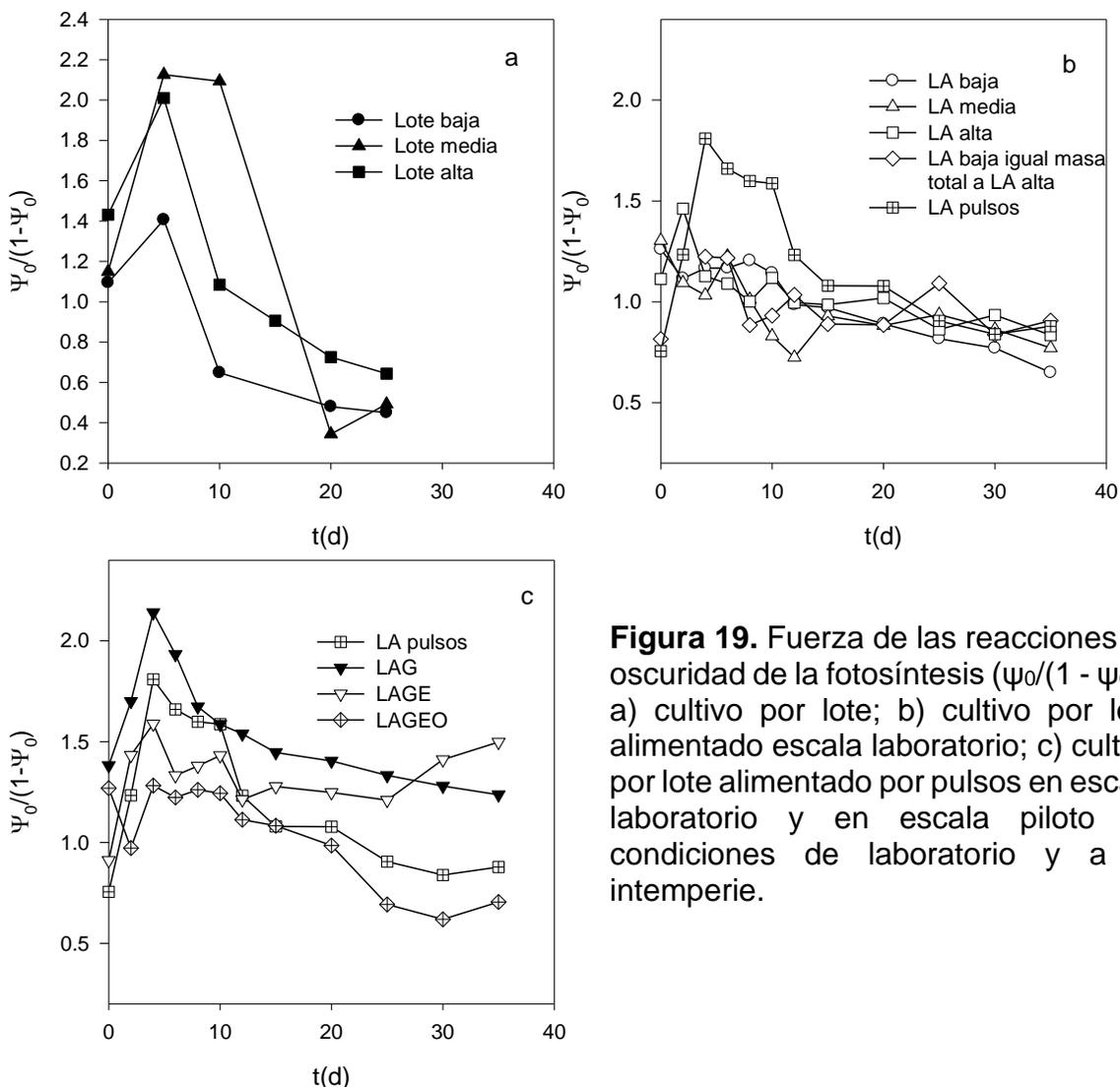


**Figura 18.** Contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria  $F_v/F_o$ , a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

#### 6.4.5.3. Fuerza de las reacciones de la oscuridad de la fotosíntesis ( $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ )

El tercer término del cálculo implicado en el índice de desempeño fotosintético (PI) se refiere a la fuerza de las reacciones de la oscuridad. Es importante resaltar que todos los valores máximos en lote alimentado se presentaron durante el periodo de alimentación. Se observó nuevamente que se presentó un comportamiento de aumento inicial hasta un punto máximo y una

posterior disminución hacia el final del cultivo en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento LAGE cuya magnitud final no disminuyó.



**Figura 19.** Fuerza de las reacciones de oscuridad de la fotosíntesis ( $\psi_0/(1 - \psi_0)$ ), a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

La magnitud máxima en cultivo por lote (Fig. 19a) se presentó el día 5 de cultivo en todos los tratamientos, con valores de 1.4, 2.12 y 2 para Lote baja, Lote media y Lote alta, respectivamente. Sin embargo, no hubo relación directa con la concentración inicial de N.

En lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 19b), se tuvieron magnitudes máximas de 1.2 para LA baja y LA baja de igual masa total de N a LA alta. En LA

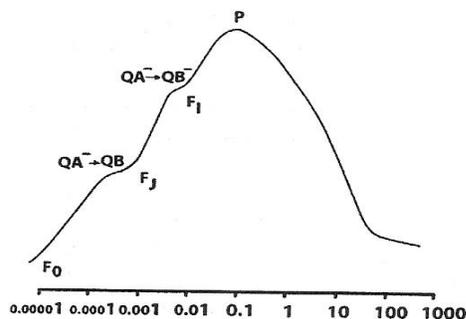
media se obtuvo 1.3, y en LA alta 1.4. Mientras que en LA pulsos se obtuvo una máxima magnitud de 1.8.

En el tratamiento en escala piloto en condiciones controladas, LAG, la máxima magnitud de 2.13, fue la mayor registrada y fue hasta 1.77 veces superior a la de otros tratamientos. Los tratamientos en escala piloto a la intemperie LAGE y LAGEO presentaron magnitudes máximas de 1.5 y 1.26, respectivamente.

El hecho de que los parámetros de fluorescencia, eficiencia fotosintética máxima ( $F_v/F_m$ ) y operacional ( $F_q'/F_m'$ ), índice de desempeño fotosintético (PI), tamaño relativo de la antena que sirve a cada centro de reacción (RC/ABS), contribución de las reacciones de la luz a la fotoquímica primaria ( $F_v/F_0$ ) y fuerza de las reacciones de la oscuridad ( $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ ), presentaran en lote alimentado magnitudes mayores a las de cultivo por lote nos indica que la implementación de lote alimentado autotrófico favorece el proceso de fotosíntesis de manera integral, desde la absorción de la energía luminosa, la liberación y el transporte de electrones por los fotosistemas, hasta la fijación del  $\text{CO}_2$  en el ciclo de Calvin. Debido a esto se piensa que el utilizar lote alimentado favorece una mayor eficiencia fotosintética.

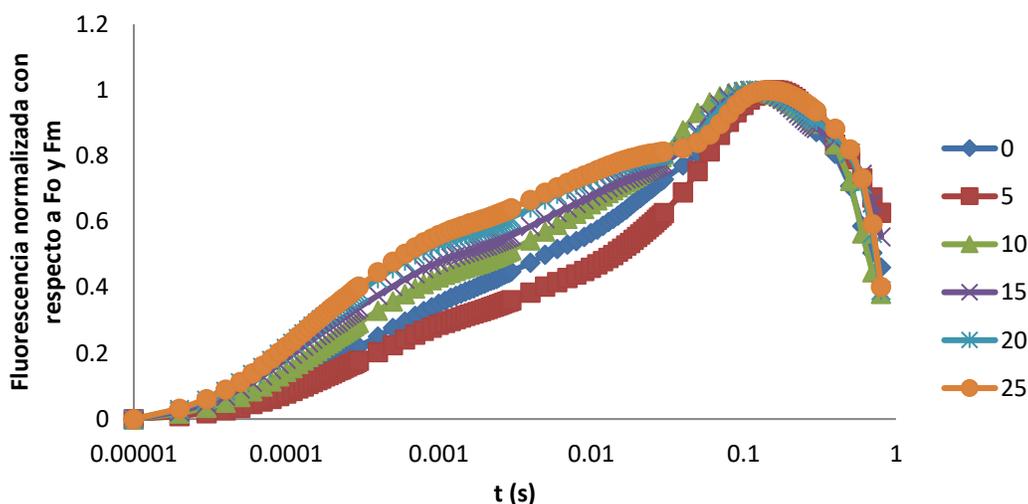
#### 6.4.6. Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a $F_0$ y $F_m$

Las mediciones de fluorescencia proveen información adicional acerca del comportamiento de los transportadores de electrones del fotosistema II. El paso de electrones en el fotosistema II (PSII) requiere que se transfieran electrones a través de  $Q_A$  y  $Q_B$ , esta transferencia de electrones se refleja en la cinética de fluorescencia en dos puntos de inflexión de la curva que se han denominado  $F_J$  y  $F_I$  (Fig. 20) (Henriques, 2009),  $F_J$  ha sido asociado como el paso del primer electrón de  $Q_A$  a  $Q_B$  mientras que  $F_I$  ha sido asociado como el paso de un segundo electrón de  $Q_A$  a  $Q_B$ .



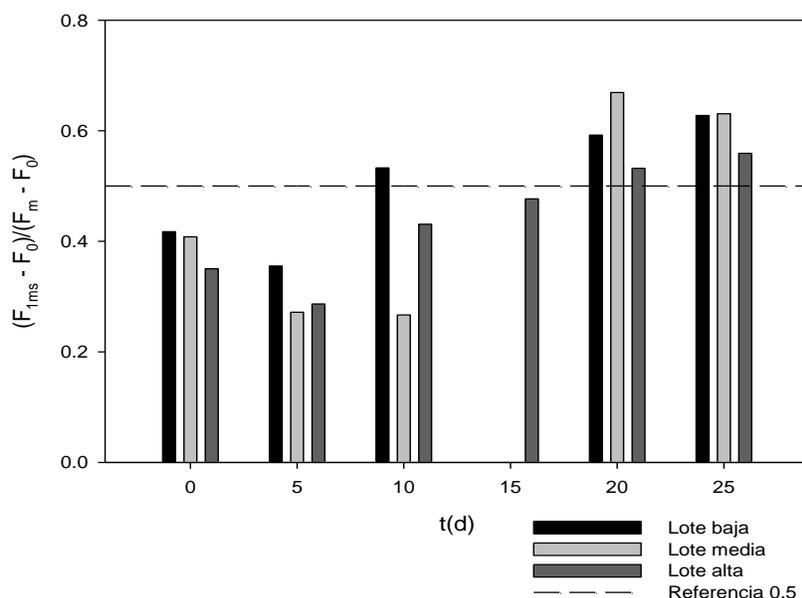
**Figura 20.** Cinética de fluorescencia típica de plantas y algas clorofíceas (Henriques, 2009).

Realizando la cuantificación de las cinéticas de fluorescencia a diferentes tiempos de cultivo de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* (Fig. 21), presentada con una normalización con respecto a  $F_0$  y  $F_m$  para su mejor comparación, se ha podido observar que al tiempo de 1ms es donde se presentan las mayores diferencias entre los diferentes tiempos de cultivo. Por lo que resultó conveniente extraer los datos de fluorescencia normalizada a 1ms de todos los tratamientos a diferentes tiempos de cultivo, tanto en lote como en lote alimentado, los cuales se presentan en las figuras 22, 23 y 24.



**Figura 21.** Cinética de fluorescencia típica de *Scenedesmus incrassatulus* a diferentes tiempos de cultivo (los números a la derecha representan los días de cultivo a los cuales se realizó la medición).

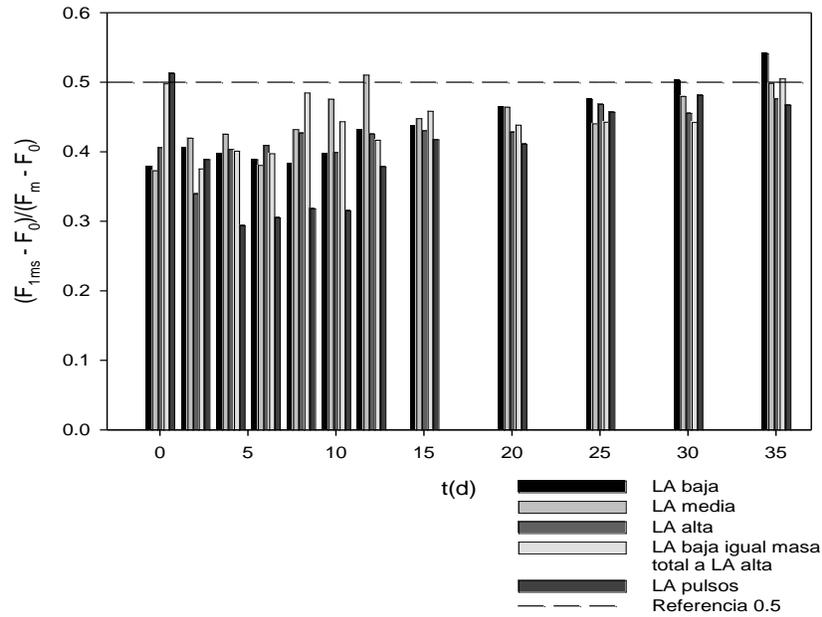
Se ha colocado de manera arbitraria una línea de referencia a una magnitud de 0.5. Estos valores han podido ser asociados con el crecimiento de manera inversa. Los cultivos presentaron crecimiento exponencial cuando hay una magnitud de la fluorescencia normalizada por debajo de 0.5, y cuando la magnitud es superior a 0.5 se presenta la fase estacionaria. Como se puede observar en cultivo por lote (Fig. 22) se presenta una magnitud de la fluorescencia normalizada menor a 0.5 al inicio de todos los cultivos y después del día 10 de cultivo se empiezan a alcanzar valores superiores a 0.5, es decir, se instaura la fase estacionaria de crecimiento.



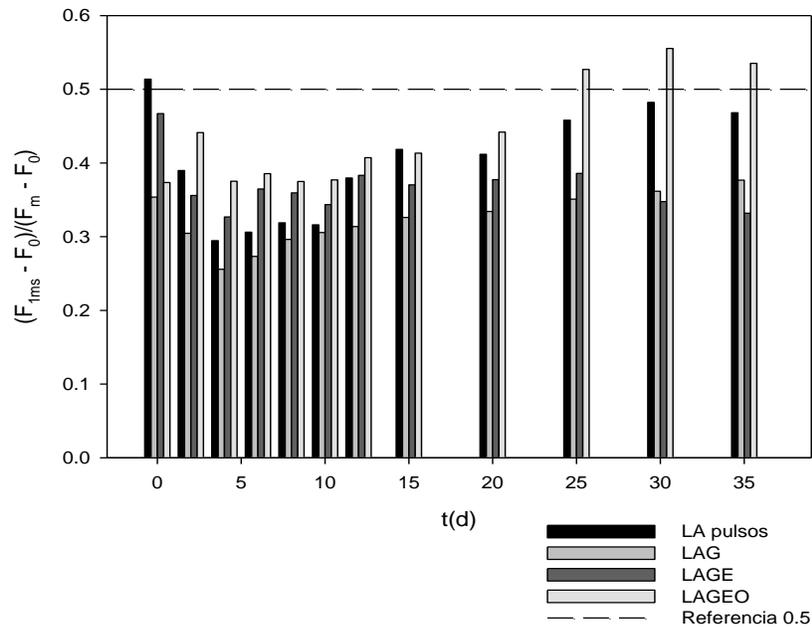
**Figura 22.** Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a  $F_0$  y  $F_m$  en cultivo por lote.

En la mayoría de los tratamientos en lote alimentado se presenta el mismo comportamiento, pero existen algunos puntos en los que los cultivos estaban creciendo exponencialmente y hubo magnitudes de la fluorescencia normalizada por encima de 0.5. Lo que indica que en lote alimentado el comportamiento es más complejo y no sigue la misma tendencia que cultivo por lote, es decir, que en lote alimentado este parámetro no fue un buen indicador del crecimiento exponencial del cultivo, y su relación con otros parámetros fue nula.

Aunque las mediciones de fluorescencia han resultado útiles e importantes para describir el comportamiento, eficiencia y desempeño de los fotosistemas en los diferentes tratamientos, es necesario ahora retomar la parte medular de este estudio que es la producción de pigmentos, por lo que a continuación se presentan los resultados de los mismos.



**Figura 23.** Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a  $F_0$  y  $F_m$  en cultivo por lote alimentado en escala laboratorio.



**Figura 24.** Fluorescencia a 1ms normalizada con respecto a  $F_0$  y  $F_m$  ( $V_{1ms}$ ) en cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y escala piloto, en condiciones controladas y a la intemperie.

## 6.5. Pigmentos

Los pigmentos que producen las microalgas Clorofíceas, como *Scenedemus incrassatulus*, se requieren para la captación de la energía solar. Existen dos tipos de principales pigmentos en este tipo de microalgas: las clorofilas (*a* y *b*) y los carotenoides totales, la luteína forma parte de este último grupo. La clorofila *a* se encuentra en el centro de reacción, la clorofila *b* se encuentra en los complejos antena. Los carotenoides se encuentran en los complejos antena y son denominados pigmentos accesorios debido a que ayudan a la captación de la energía solar ampliando el espectro de energía solar captada, se requieren como parte estructural de los fotosistemas y brindan protección contra el exceso de energía, a la que se ven expuestas las clorofilas *a* y *b*, y finalmente estabilizan los fotosistemas.

Las clorofilas y los carotenoides forman parte de un sistema que trabaja en conjunto de forma coordinada por lo que la discusión estaría incompleta si no incluyéramos a todos los pigmentos y su comportamiento en los diferentes tratamientos y escalas de cultivo empleadas. El orden en el que se presentan los datos y su discusión es el siguiente: concentración volumétrica, contenido específico, relación Clorofila *a*/ Clorofila *b*, Carotenoides totales/ clorofila total, contenido de luteína, y finalmente la productividad de pigmentos y su rendimiento con respecto a los nutrientes.

### 6.5.1. Concentración volumétrica de carotenoides totales, clorofila total, clorofila *a* y clorofila *b*

El incluir los resultados obtenidos de todos los pigmentos permite visualizar la importancia y efectos que tiene la aplicación de lote alimentado sobre los mismos. Empezaremos con los resultados y discusión de la concentración de carotenoides totales (Fig. 25).

Aumentar la concentración inicial de N resultó en un aumento en la concentración volumétrica máxima de carotenoides totales en cultivo en lote, con la tendencia Lote alta>Lote media>Lote baja. La concentración volumétrica máxima

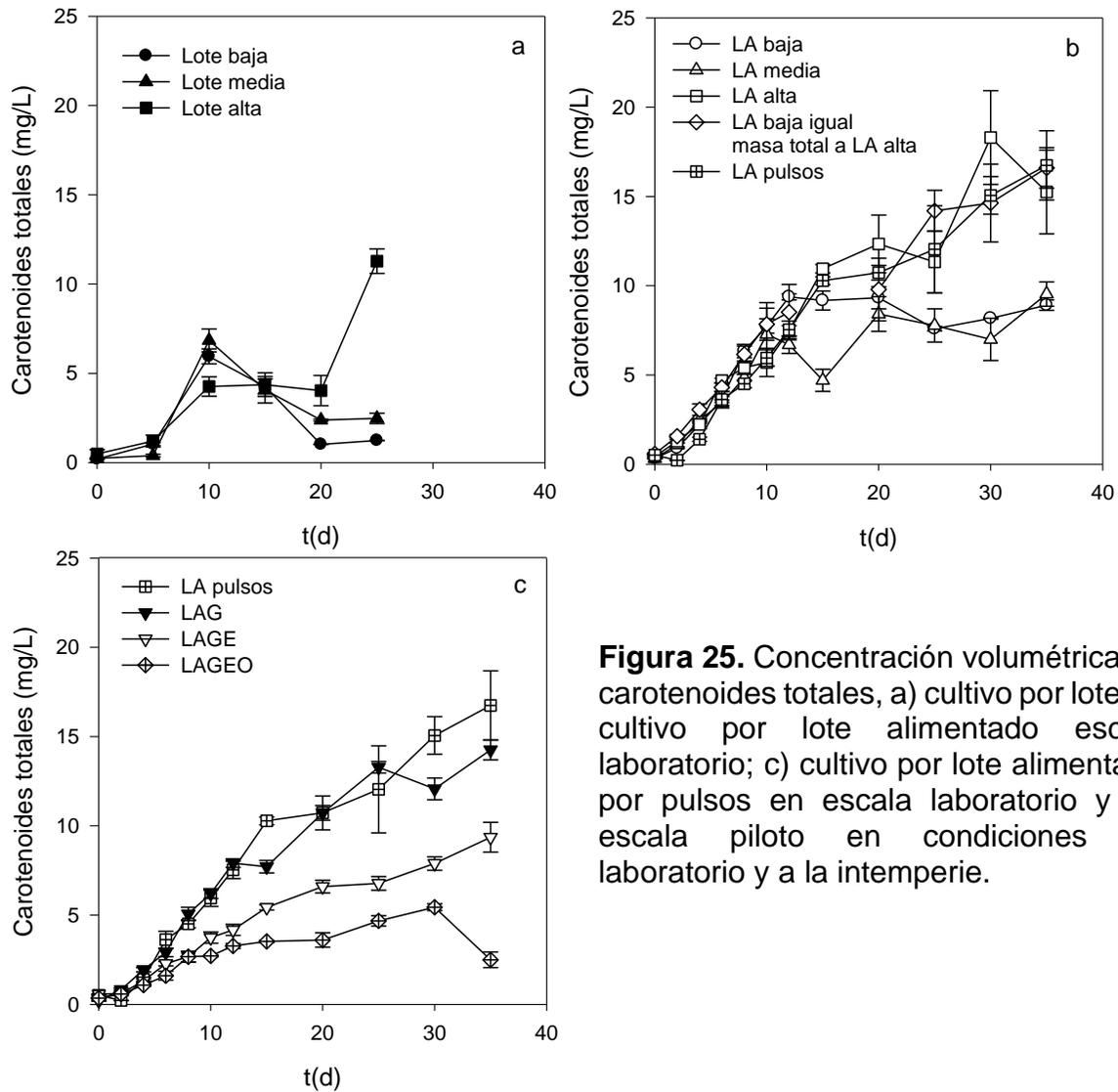
del tratamiento Lote baja fue de 5.95 y Lote media de 6.84 mg/L, al día 10 de cultivo. En cambio, en Lote alta se alcanzó una concentración de 11.27 mg/L, al día 25 de cultivo. Esta última concentración fue superior hasta 1.89 veces a la de los otros tratamientos en cultivo por lote.

Por otra parte, en lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 25b), se obtuvo una concentración máxima de carotenoides totales de 9.37, 9.53 y 18.29 mg/L en los tratamientos LA baja, LA media y LA alta, los días 12, 35 y 30, respectivamente. Aunque estas concentraciones máximas no coincidieron en el mismo día de cultivo, se mantuvo la misma tendencia observada: aumentar la concentración inicial de N resultó en un aumento en la concentración volumétrica máxima de carotenoides totales en cultivo por lote alimentado.

Para verificar si fue la concentración de N mantenida durante la alimentación o la masa total de N la que brindó este resultado, se implementó el tratamiento LA baja de igual masa total de N a LA alta. En este último tratamiento se observó una concentración máxima de carotenoides totales de 16.59 mg/L al día 35 de cultivo, esta concentración fue solamente 1.7 mg/L inferior a la del tratamiento LA alta. Este resultado nos indica que la masa total de N tiene un efecto directamente proporcional sobre la concentración máxima de carotenoides totales obtenida.

Esta última aseveración fue confirmada al implementar el tratamiento LA pulsos, el cual resultó en una concentración máxima de carotenoides totales de 16.74 mg/L, al día 35 de cultivo. Por lo tanto, la masa total de N es la que mayor influencia tiene sobre la concentración de carotenoides totales debido a que en los tratamientos, LA alta, LA pulsos y LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se obtuvieron concentraciones similares de carotenoides totales.

Se puede afirmar que la concentración de N mantenida no tiene ningún efecto sobre la concentración máxima de carotenoides totales. Como la concentración de N mantenida en el medio fue la misma en los tratamientos LA alta y LA pulsos, la cual fue mayor con respecto al tratamiento LA baja (de igual masa total de N que LA alta).



**Figura 25.** Concentración volumétrica de carotenoides totales, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

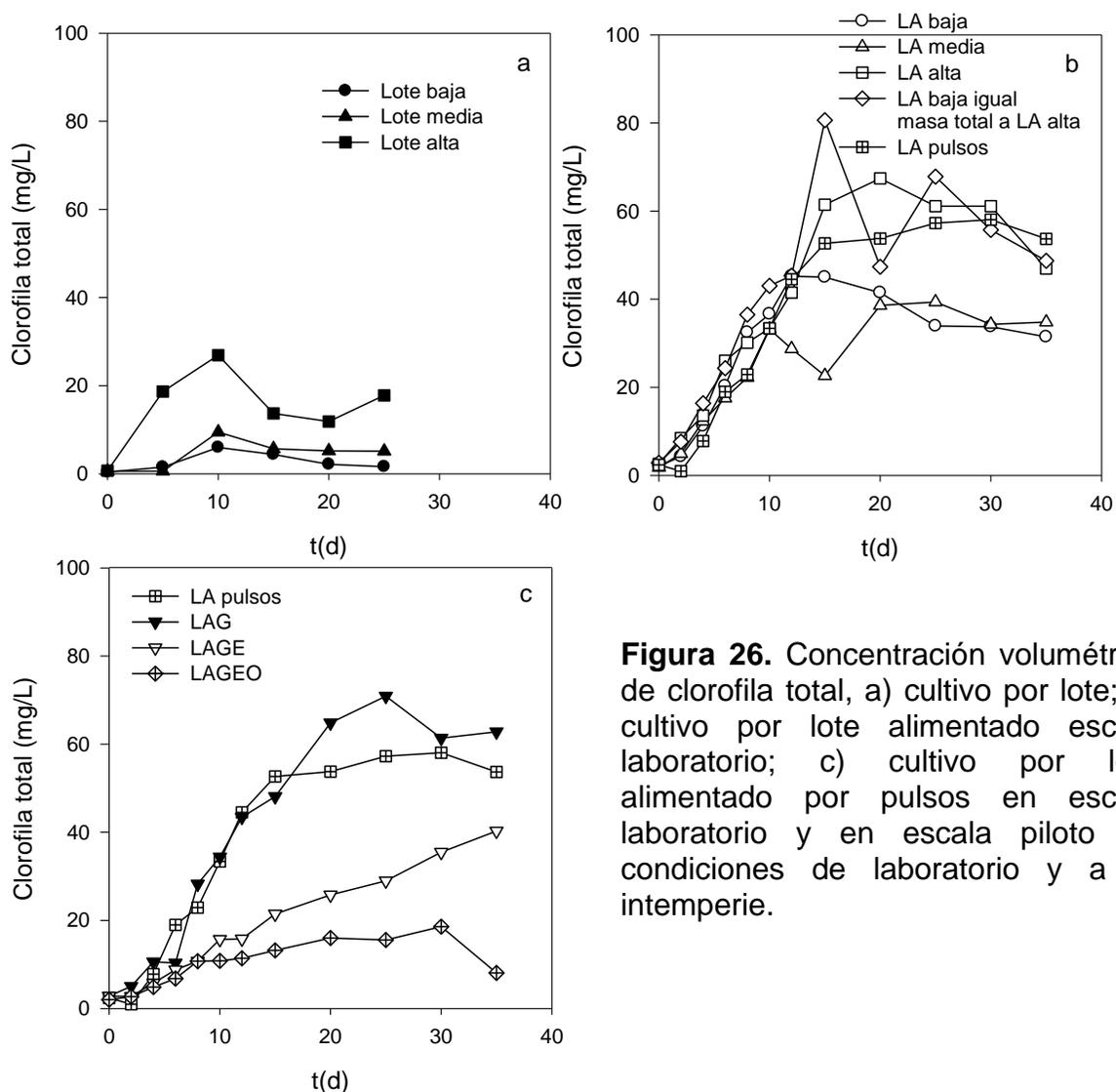
La concentración volumétrica máxima de carotenoides totales en lote alimentado en escala piloto (Fig. 25c) fue de 14.25, 9.36 y 5.44 mg/L para los tratamientos en condiciones controladas LAG, y a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO, respectivamente, al día 35 para los primeros dos tratamientos mencionados y el día 30 para LAGEO. Esto nos indica que en condiciones controladas de laboratorio (LAG) se obtuvo mayor concentración que en los tratamientos implementados a la intemperie. En este mismo orden de ideas, se puede afirmar que al implementar el cultivo a la intemperie la concentración de carotenoides totales fue mayor en verano que en otoño.

Debido a que en verano hay más horas de luz que en otoño, se puede pensar que la mayor cantidad de horas luz en el día en verano ayudó a que se presentara ese resultado superior; sin embargo, el que se presenten menos horas de luz en otoño también va asociado con más horas a la temperatura menor registrada (la cual se presentó en la sección de condiciones de luz y temperatura a la intemperie), por lo que el resultado obtenido puede ser el efecto combinado de la luz, temperatura y concentración de nutrientes que se presentan a la intemperie. Por lo que el estudio de cultivos a la intemperie es más complejo y puede ser estudiado como una línea de investigación.

La concentración de clorofila total también fue registrada. En la figura 26a observamos que en cultivo por lote se presentó la máxima concentración volumétrica de clorofila total al día 10, con una magnitud de 5.98, 9.46 y 26.89 mg/L para Lote baja, Lote media y Lote alta, respectivamente. Es decir, en Lote baja se obtuvo el resultado más pequeño, pero al aplicar Lote media, es decir aumentar la concentración inicial de N casi al doble, aumentó 1.58 veces la concentración máxima de clorofila total. Y al aplicar Lote alta, con una concentración inicial de N de aproximadamente 4 veces superior con respecto a Lote baja, se obtuvo una concentración de clorofila total 4.5 veces mayor con respecto al tratamiento Lote baja. Por lo tanto, se puede afirmar que la concentración máxima de clorofila total tiene una relación directamente proporcional con la concentración inicial de N, en cultivo por lote.

En cambio, en lote alimentado en escala laboratorio (Fig.26b) no hubo diferencias en la concentración de clorofila total desde el inicio hasta el día 10 de cultivo. Después del día 10 de cultivo se empezaron a ver las diferencias entre los tratamientos. En LA baja se obtuvo una concentración máxima de 45.23 mg/L, al día 12 de cultivo, es decir al final de la alimentación. Mientras que en LA media se obtuvo una concentración máxima de 39.37 mg/L, al día 25 de cultivo. En los tratamientos LA alta, LA pulsos y LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se obtuvo una concentración de clorofila total de 67.41, 67.81 y 58.05 mg/L, los días 20, 25 y 30 de cultivo, respectivamente. Es importante mencionar que en el caso de LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se presentó una concentración máxima

de clorofila total de 80.6 al día 15 de cultivo, es decir al final del periodo de alimentación.



**Figura 26.** Concentración volumétrica de clorofila total, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

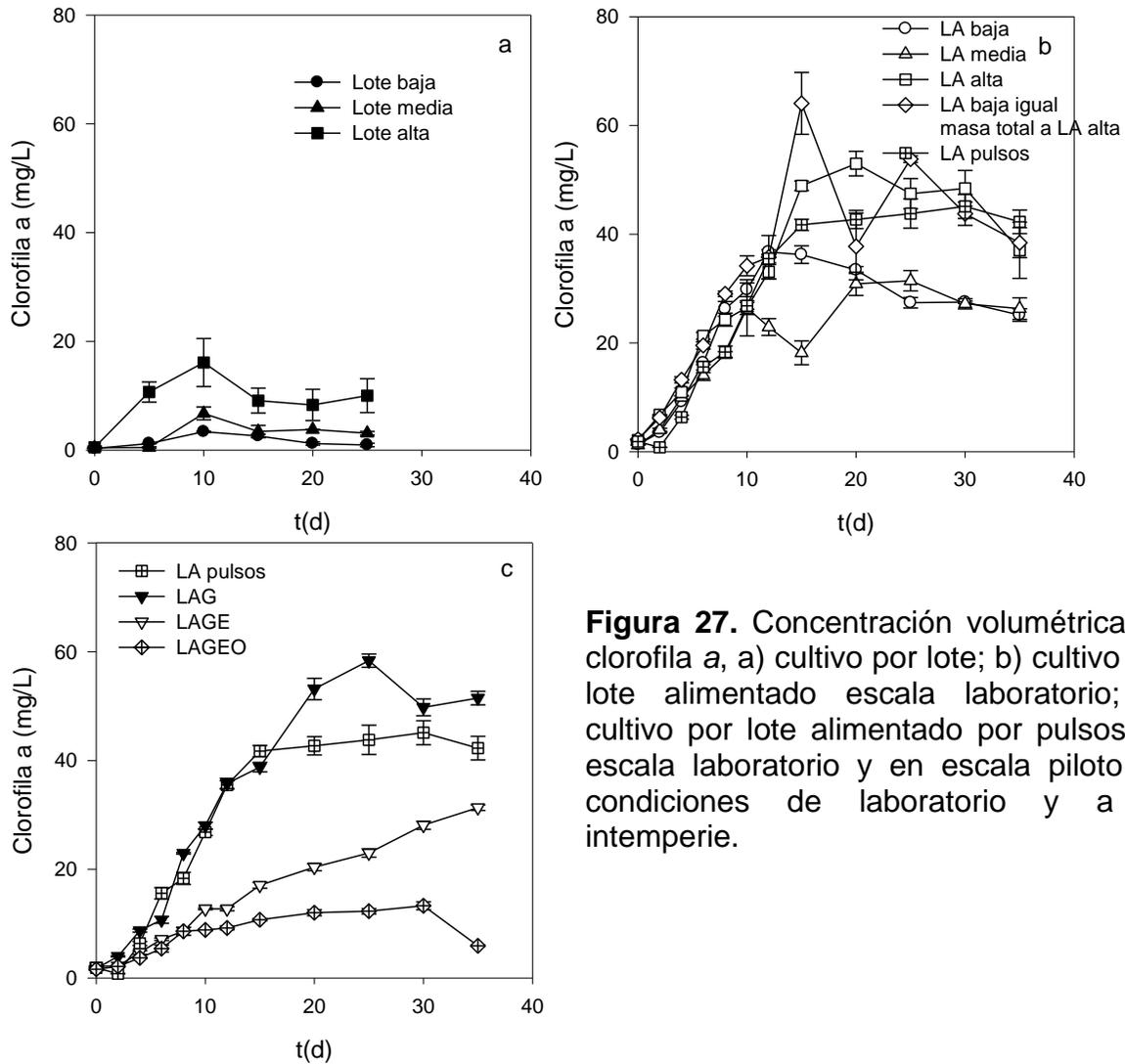
Es evidente al comparar los tratamientos LA alta con LA baja que una mayor masa total de N favoreció una concentración superior de clorofila total, ya que un aumento de la masa total de N en 1.26 veces aumentó la concentración de clorofila total 1.49 veces. También los resultados indican que la concentración mantenida de N no tuvo ningún efecto ya que LA alta, LA pulsos y LA baja de igual masa total de N, presentaron resultados similares sin diferencias significativas entre ellos.

En el tratamiento en escala piloto en condiciones controladas, LAG, se obtuvo una concentración de clorofila total de 70.90 mg/L. Se puede observar en la figura 26c, que los tratamientos en escala laboratorio, LA pulsos, y en escala piloto, LAG, presentaron durante todo el periodo de cultivo concentraciones similares de clorofila total.

Al implementar lote alimentado a la intemperie se observó un efecto negativo sobre la concentración de clorofila total ya que en los tratamientos a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO se obtuvo una concentración máxima de clorofila total de 40.27 y 18.57, respectivamente. Por lo que la concentración de clorofila total al igual que los carotenoides totales fue superior en verano que en otoño.

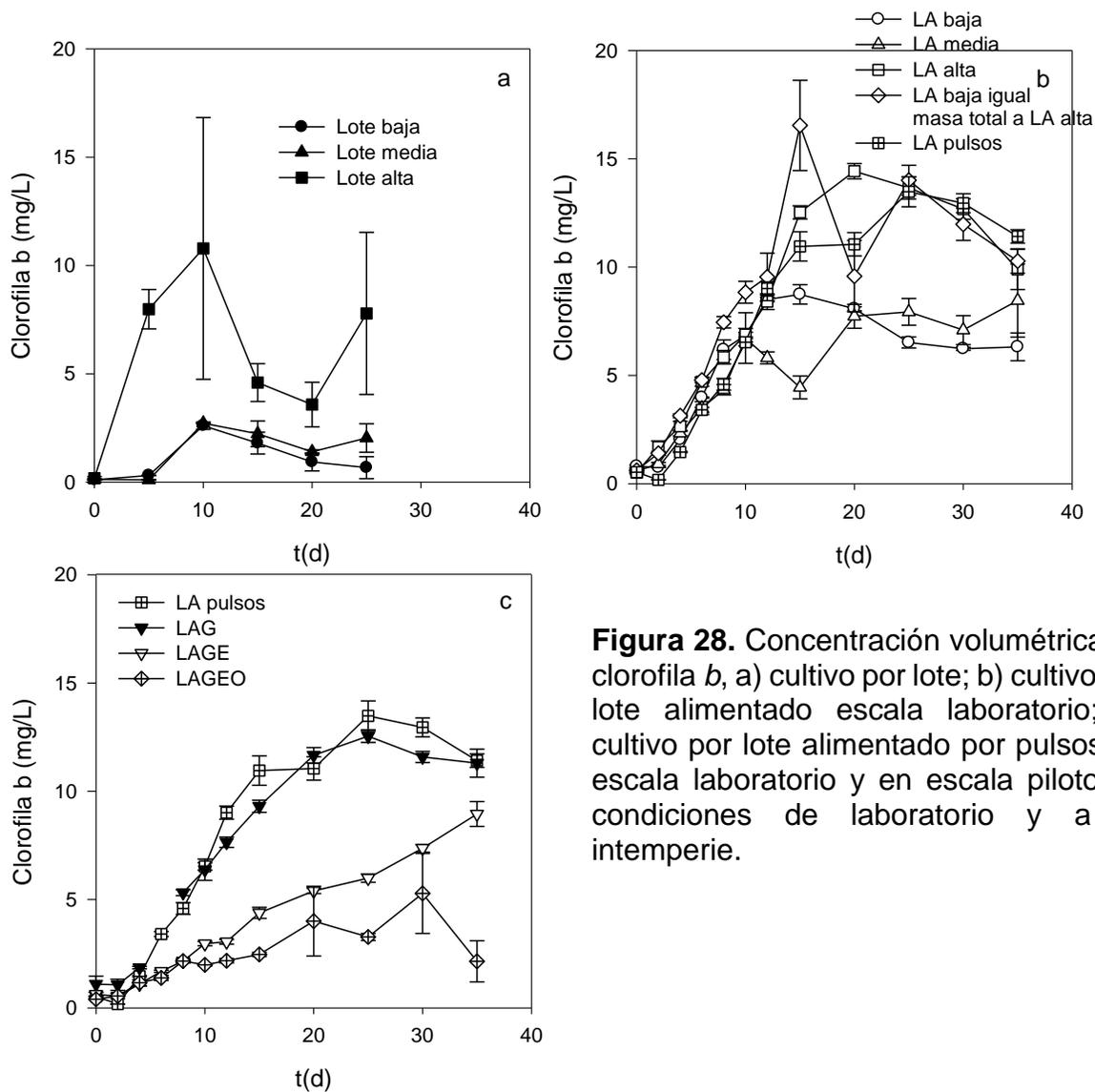
Las microalgas clorofíceas, como es el caso de *Scenedesmus incrassatulus*, tienen clorofila *a* y clorofila *b*, las cuales sumadas nos brindan la cantidad de clorofila total. Gracias a que se implementó la extracción de pigmento con acetona, se pudieron evaluar las concentraciones de la clorofila *a* y clorofila *b* por separado (Fig. 27 y 28). Tanto la concentración de clorofila *a* como la de clorofila *b* tienen el mismo comportamiento observado y discutido para la clorofila total.

Por lo anterior, todas las afirmaciones hechas para la concentración de clorofila total son aplicables para las concentraciones de clorofila *a* y clorofila *b*. Es decir, que en cultivo por lote tanto la concentración de clorofila *a* como la de clorofila *b* fue en mayor en Lote alta que en Lote media y Lote baja. Concluyendo que aumentar la concentración inicial de N aumentó la concentración de las fracciones de clorofila.



**Figura 27.** Concentración volumétrica de clorofila a, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Por otra parte, en lote alimentado una masa total de N mayor favoreció una concentración superior de clorofila a y b, y la concentración mantenida de N no tuvo ningún efecto ya que LA alta LA pulsos y LA baja (de igual masa total de N) presentaron resultados similares sin diferencias significativas. En los cultivos en escala piloto se obtuvo una concentración mayor de pigmentos en condiciones controladas que a la intemperie. Finalmente, la concentración de clorofila a y b de los cultivos implementados a la intemperie fue superior en verano que en otoño.



**Figura 28.** Concentración volumétrica de clorofila *b*, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

### 6.5.2. Contenido específico de carotenoides totales, clorofila *a* y clorofila *b*

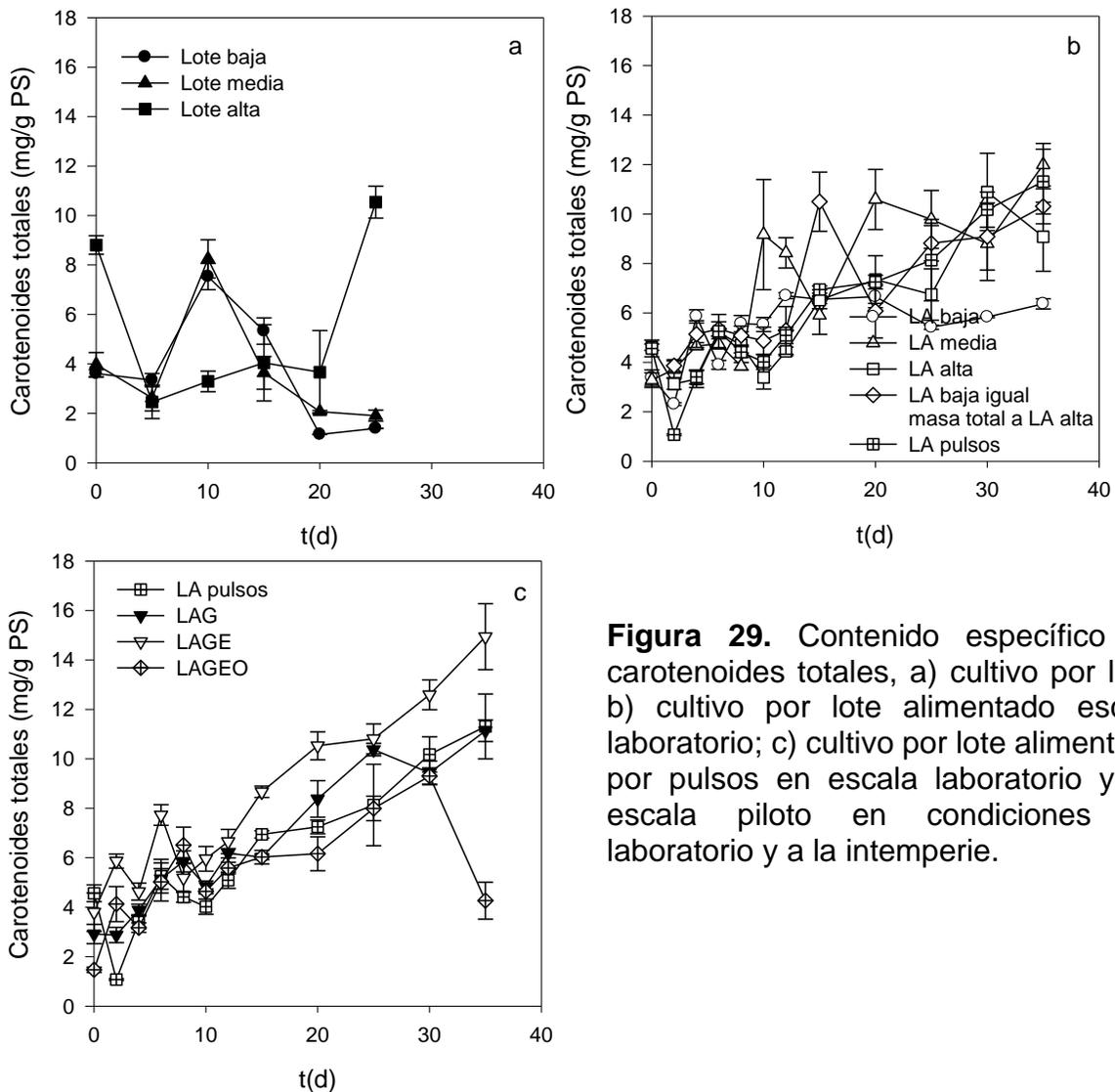
El contenido específico de pigmentos es la cantidad de pigmentos que hay por unidad de biomasa. Debido a que el crecimiento autotrófico depende del proceso fotosintético, el cual depende, a su vez, del contenido intracelular de pigmentos, es muy importante conocer su variación en el tiempo, ya que su variación da cuenta de cuán grandes son los fotosistemas que captan la energía solar.

En cultivo por lote (Fig. 29a), se puede observar que los tratamientos Lote baja y Lote media tuvieron un contenido de carotenoides totales máximo de 7.53 y

8.24 mg/g peso seco, al día 10 de cultivo, respectivamente. Mientras que Lote alta tuvo un contenido de 10.54 mg/g peso seco al día 25 de cultivo, este último valor fue mayor en magnitud al de los otros tratamientos realizados en cultivo por lote. Es decir que el contenido específico de carotenoides totales fue mayor hasta 1.4 veces en el tratamiento de mayor concentración inicial de N, aunque con una concentración de N casi 4 veces mayor. Por lo tanto, aumentar la cantidad de N 4 veces en cultivo por lote, sólo aumenta la cantidad de carotenoides totales contenidos en la biomasa en un 40%, por lo que el empleo de cantidades mayores de N en cultivo por lote no serían recomendables, ya que un aumento muy grande en la cantidad de N produciría un aumento modesto en el contenido de carotenoides totales, además de que el mismo se obtiene en un mayor periodo de tiempo.

En cultivo por lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 29b), hay mayor homogeneidad entre los tratamientos, observándose diferencias sólo después del día 10 de cultivo. En este caso destacan los tratamientos LA media, LA alta, LA pulsos y LA baja (con igual masa total de N a LA alta), con contenidos de carotenoides totales hacia el final del cultivo en un rango de 10.3-11.99 mg/g peso seco; sin embargo, es importante aclarar que no hubo diferencias significativas entre estos tratamientos con los más altos contenidos de carotenoides totales.

Por otra parte, en lote alimentado en escala piloto (Fig. 29c) destacaron los tratamientos en condiciones controladas, LAG, y a la intemperie en verano, LAGE, que al final del tiempo de cultivo tuvieron un contenido de carotenoides totales de 11.13 y 14.93 mg/g peso seco, respectivamente. Mientras que el tratamiento a la intemperie en otoño, LAGEO, llegó a presentar un contenido de 9.3 mg/g peso seco solamente. Es decir que en el tratamiento en lote alimentado en escala piloto a la intemperie implementado durante el verano (LAGE), se logró obtener un contenido de carotenoides totales mayor al de todos los demás tratamientos, el cual fue aproximadamente 30% mayor al máximo obtenido en escala laboratorio en condiciones controladas.



**Figura 29.** Contenido específico de carotenoides totales, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Al comparar el contenido de carotenoides totales observado en este estudio con el reportado en otros estudios (Tabla 13), se puede afirmar que en el presente estudio se han obtenido contenidos de carotenoides totales mayores a los reportados para otras cepas de microalgas.

Pasando ahora al contenido específico de clorofila *a* (Fig. 30), se pudo observar que fue 4 veces superior en el tratamiento Lote alta que el máximo encontrado en el tratamiento Lote baja y 2.68 veces superior al de Lote media. El contenido máximo de clorofila *a* de 21.8 mg/g peso seco en cultivo por lote se obtuvo en el tratamiento Lote alta (Fig. 30a).

Al igual que con el contenido de carotenoides totales, en el contenido de clorofila *a* en cultivo por lote alimentado en escala laboratorio (Fig. 30b) no hubo diferencias en los diferentes tratamientos durante el periodo de alimentación. Sin embargo, destacan los tratamientos LA media y LA baja (de igual masa total a LA alta) que presentaron un contenido de clorofila *a* de aproximadamente 39 mg/g peso seco, aunque los tratamientos LA baja, LA alta y LA pulsos también tuvieron magnitudes máximas altas de 26.2, 31.54 y 30.47 mg/g peso seco, respectivamente. Lo anterior nos indica que en escala laboratorio todos los tratamientos en lote alimentado presentaron un mayor contenido de clorofila *a* que en cultivo por lote.

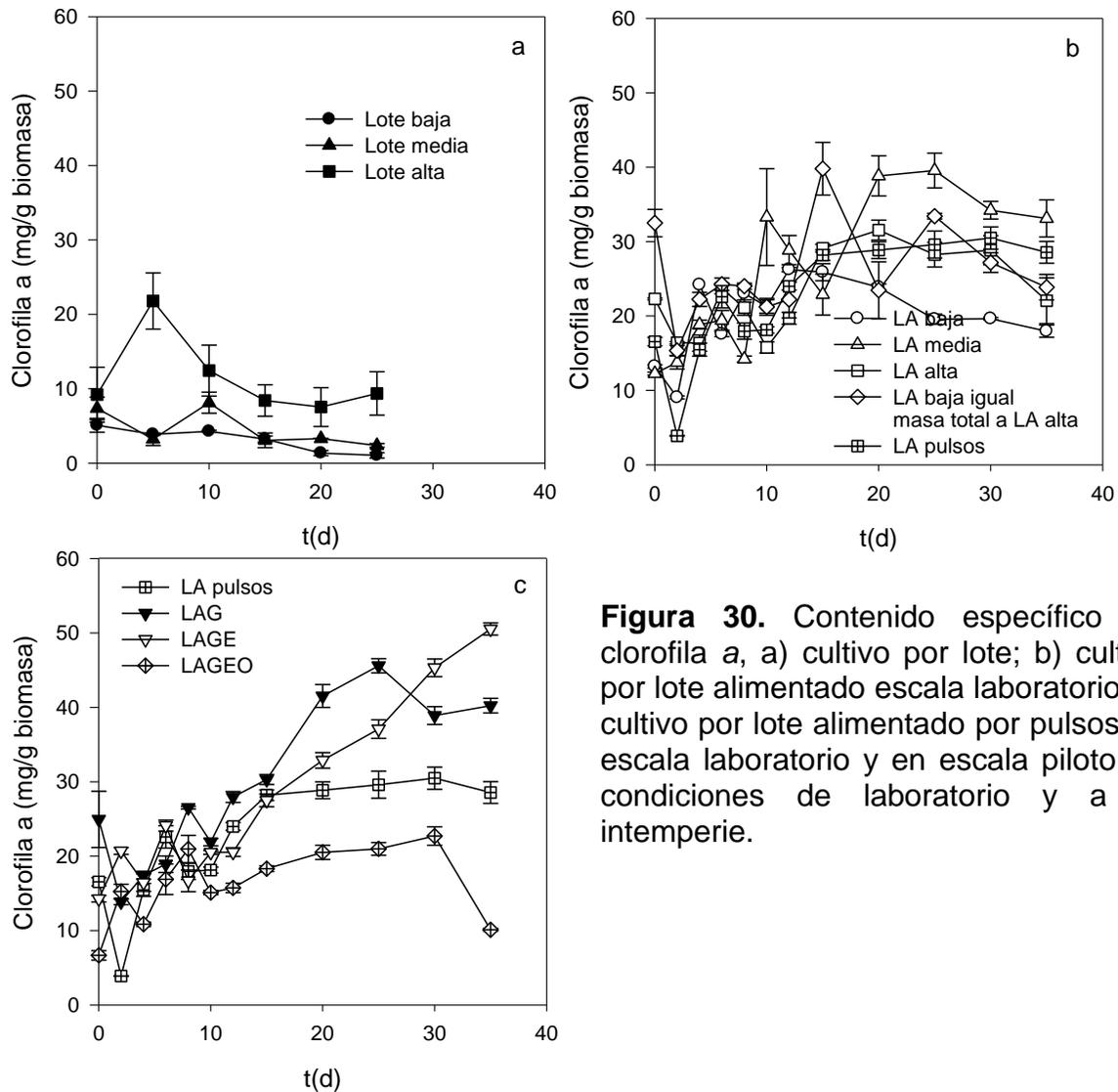
**Tabla 13.** Contenido de carotenoides totales en diferentes microalgas.

Cepa	Contenido de carotenoide totales (mg/g biomasa seca)	Ref.
<i>Botryococcus braunii</i>	2.10±0.07	a
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	2.33±0.14	a
<i>Chlorella</i> spp.	0.71±0.08 - 3.04±0.20	a
<i>Haematococcus pluvialis</i>	1.89±0.05	a
<i>Isochrysis</i> sp.	7.75±0.13	a
<i>Nannochloropsis</i> sp.	2.17±0.03	a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6.14±0.16	a
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.44±0.06	a
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	6.90	b
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	10.54±0.64	Lote
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	11.99±0.85	Lote Alimentado, escala laboratorio
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	11.13±0.43	Lote Alimentado, escala piloto, condiciones controladas de laboratorio
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	14.93±1.33	Lote Alimentado, escala piloto, a la intemperie

<sup>a</sup>Goiris *et al.*, 2012; <sup>b</sup>Sánchez *et al.*, 2008a

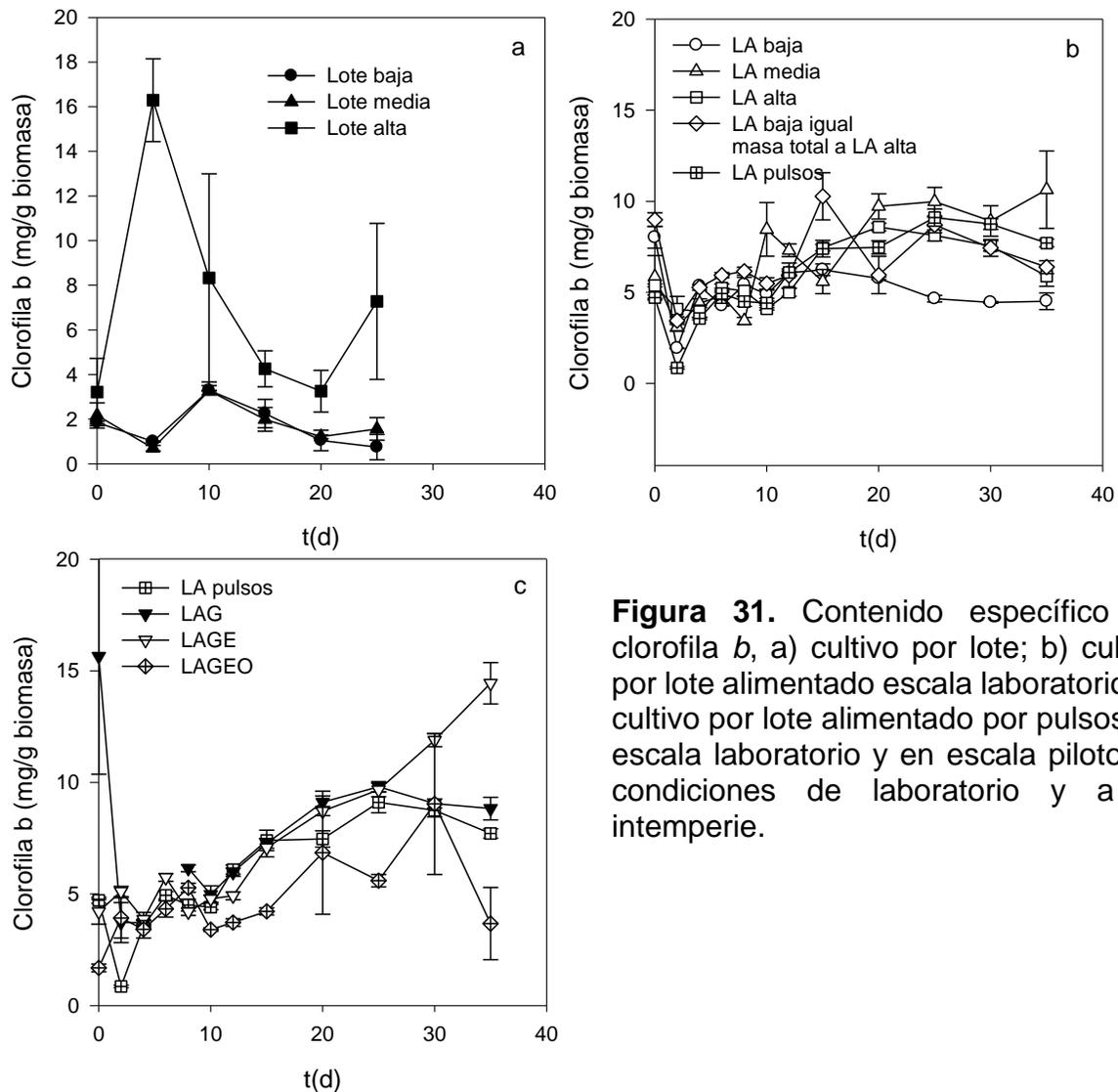
Por otro lado, en cultivo por lote alimentado en escala piloto (Fig. 30c) se obtuvo un contenido máximo de clorofila *a* de 45.6, 50.52 y 22.7 mg/g peso seco, en los tratamientos en condiciones controladas LAG, y a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO, respectivamente. Esto nos indica que a la intemperie en

verano fue donde se obtuvo un mayor contenido de clorofila *a*. La posible explicación a este comportamiento es el hecho de que en otoño a la intemperie se cuenta con menor cantidad de horas luz y temperaturas más bajas. Asimismo las condiciones de luz a la intemperie en verano promovieron un contenido específico de clorofila *a* mayor al observado en condiciones controladas de laboratorio.



El comportamiento del contenido de clorofila *b* fue similar al de la clorofila *a*. El máximo contenido de clorofila *b* observado en cultivo por lote (Fig. 31a) fue en el tratamiento Lote alta, con un valor de 16.29 mg/g peso seco. En Lote baja y Lote media se obtuvo un contenido de 3.2 mg/g peso seco.

En lote alimentado en escala laboratorio no hubo un efecto debido a la concentración de N y la masa total de N sobre el contenido de clorofila *b*. Esto debido a que no se registraron diferencias significativas entre los contenidos de clorofila *b* que presentaron los diferentes tratamientos durante la alimentación (Fig. 31b), con magnitudes de hasta 10.63 mg/g peso seco. En cultivo por lote alimentado el contenido de clorofila *b* fue más estable durante el tiempo de cultivo.



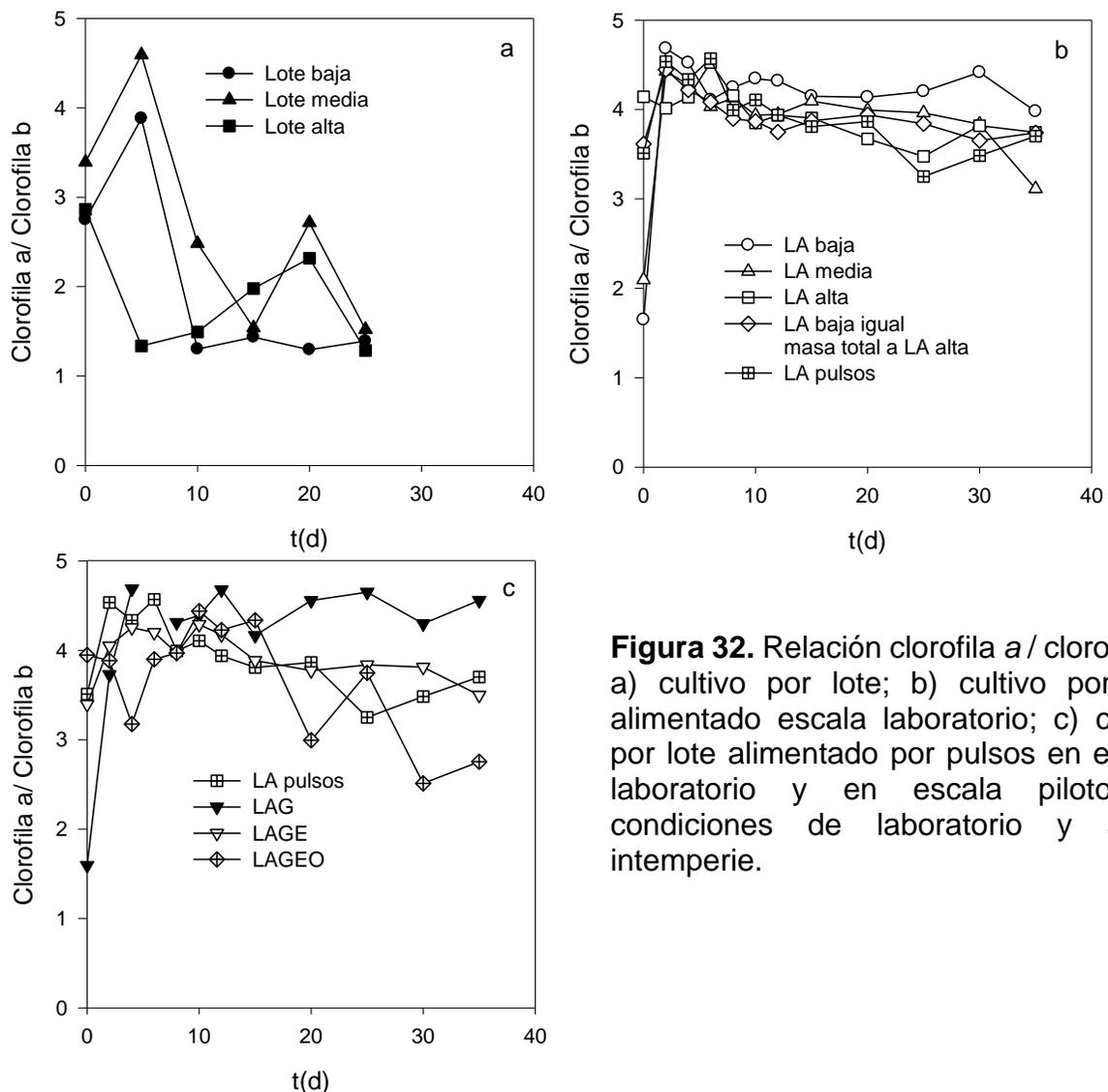
**Figura 31.** Contenido específico de clorofila *b*, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Por otra parte, el contenido máximo de clorofila *b* de los tratamiento en escala piloto LAG fue de 9.8 mg/g peso seco, mientras que en los tratamientos a la intemperie en verano LAGE y en otoño LAGEO, fue de 14.4 y 9.03 mg/g peso seco,

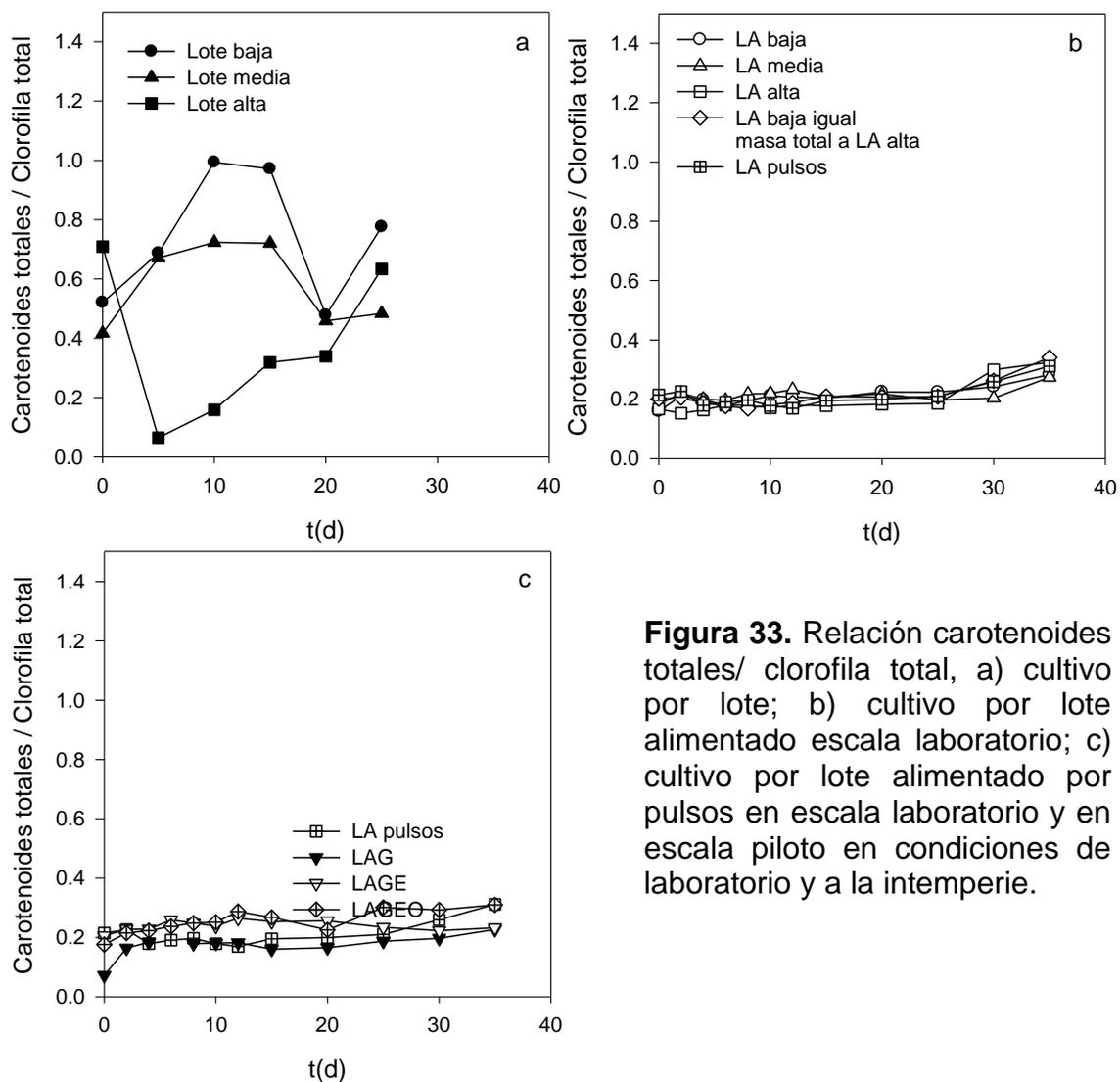
respectivamente (Fig. 31c). Por lo que nuevamente en el tratamiento implementado a la intemperie en verano fue donde hubo un mayor contenido de pigmento.

### 6.5.3. Relación de pigmentos Clorofila *a*/Clorofila *b* y Carotenoides totales/Clorofila total

Las relaciones de clorofila *a*/ clorofila *b* y de carotenoides totales son importantes indicadores del funcionamiento de los fotosistemas captadores de luz, los cuales son esenciales para el crecimiento autotrófico de microalgas. Como se puede observar en las figuras 32 y 33, las relaciones clorofila *a*/clorofila *b* y carotenoides totales/clorofila total fueron más variables en cultivo por lote. Mientras que en cultivo por lote alimentado las magnitudes de estas relaciones fueron más estables en el tiempo.



**Figura 32.** Relación clorofila *a* / clorofila *b*, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.



**Figura 33.** Relación carotenoides totales/ clorofila total, a) cultivo por lote; b) cultivo por lote alimentado escala laboratorio; c) cultivo por lote alimentado por pulsos en escala laboratorio y en escala piloto en condiciones de laboratorio y a la intemperie.

Una relación mayor de clorofila *a* con respecto a clorofila *b* nos indica que hay una mayor cantidad de centros de reacción ya que la primera se encuentra principalmente en estos. Mientras que una magnitud mayor de carotenoides totales con respecto a la cantidad de clorofila total nos indica que los fotosistemas están perdiendo su estabilidad, y empiezan a darse desequilibrios que conducen al desensamble de los fotosistemas.

En base a los resultados de las figuras 32 y 33, se puede interpretar que la implementación de lote alimentado favorece la estabilidad de los fotosistemas, lo

cual ayuda a que se mantengan altas eficiencias fotosintéticas máximas (tal como se mostró y discutió en secciones anteriores).

Estos indicadores confirman lo que se había discutido en la sección de eficiencia fotosintética máxima, y dejan claro que la alimentación favoreció la estabilidad de los fotosistemas y el crecimiento autotrófico de los cultivos implementados, lo cual resultó en un mayor crecimiento en lote alimentado en comparación con cultivo por lote (en escala laboratorio).

#### **6.5.4. Concentración volumétrica de luteína**

Antes de continuar con los resultados de luteína, es importante aclarar que se realizó la cuantificación de la misma con diferentes tipos de estándar: uno de cantaxantina y otro de luteína. Pero como en la industria de pigmentos se utiliza comúnmente el estándar de cantaxantina, las discusiones sobre luteína se basarán en el cálculo con este estándar.

En la tabla 14 se resumen los resultados de concentración volumétrica máxima de luteína calculada a partir de los estándares de luteína y cantaxantina utilizados. Es importante mencionar que la tendencia de la concentración de luteína fue la misma sin importar si el cálculo de la concentración se realizó con el estándar de luteína o con el de cantaxantina, y en el caso del estándar de luteína la tendencia se mantuvo sin importar si se consideró la concentración del estándar especificada por el fabricante o calculada utilizando el coeficiente de extinción de luteína.

En cultivo por lote se pudo observar que la concentración máxima de luteína se obtuvo al día 10 de cultivo en todos los tratamientos, y fue mayor en el tratamiento Lote alta. Es decir, la concentración volumétrica máxima de luteína aumentó al aumentar la concentración inicial de N empleada en cultivo por lote. En cultivo por lote, incrementar la concentración de N inicial en el medio de 24 a 41 mg/L resultó en un aumento de la concentración de luteína 2.91 veces, mientras que un aumento de 41 a 82 mg/L provocó un aumento de 2.55 veces en la concentración de luteína.

Se debe resaltar el hecho de que en todos los tratamientos implementados en cultivo por lote alimentado, se obtuvo una concentración máxima de luteína superior a la obtenida en cultivo por lote, tanto en escala laboratorio como en escala

piloto a diferentes días de cultivo, como se muestra en la tabla 14. También es importante mencionar que la concentración volumétrica máxima de luteína coincide con la concentración mínima de N en el medio, tanto en cultivo por lote como en lote alimentado, en escala laboratorio.

**Tabla 14.** Concentración volumétrica de luteína determinada a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.

Escala	Tratamiento	Concentración volumétrica de luteína (mg/L)		
		Estándar de referencia		
		Luteína (concentración calculada a partir de coeficiente de extinción)	Luteína (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)	Cantaxantina (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)
Laboratorio	Lote baja	1.3447 (10)	0.9051 (10)	0.7627 (10)
	Lote media	3.3838 (10)	2.2505 (10)	2.2202 (10)
	Lote alta	8.2327 (10)	5.4506 (10)	5.6771 (10)
	LA baja	10.4848 (10)	6.9507 (10)	7.1298 (10)
	LA media	10.9277 (20)	7.2643 (15)	7.2095 (15)
	LA alta	16.1952 (15)	10.7025 (15)	11.3882 (15)
	LA baja igual masa total a LA alta	10.6018 (20)	7.0095 (20)	7.4179 (20)
	LA pulsos	17.4939 (15)	11.5727 (15)	12.1688 (15)
Piloto	LAG	11.9332 (20)	7.90585 (20)	8.1711 (20)
	LAGE	10.2575 (25)	6.784 (25)	7.154 (25)

() entre paréntesis se muestra el día de cultivo en el cual se obtuvo la concentración máxima de luteína en ese tratamiento.

En la tabla 14 se observa que las mayores magnitudes de concentración volumétrica máxima de luteína se obtuvieron en los tratamientos LA alta y LA pulsos

al día 15 de cultivo. En estos tratamientos la concentración máxima de luteína fue hasta 2.1 veces mayor a la obtenida en el tratamiento Lote alta.

Comparando en base a la masa total de N utilizada se vio que la masa total de N empleada en cultivo por Lote alta fue 147.6 mg con respecto a la empleada en el tratamiento LA pulsos, de 320 mg; se puede ver que la misma fue 2.1 veces superior en LA pulsos. Por lo tanto, un aumento en la cantidad de masa total de N de 2.1 veces resultó en un aumento de 2.1 veces en la concentración volumétrica máxima de luteína, y este aumento se observó en sólo 5 días adicionales de cultivo, ya que en Lote alta se alcanzó al día 10 mientras que en lote alimentado se alcanzó al día 15.

Al comparar el tratamiento La baja contra LA baja de igual masa total de N a LA alta, se puede observar que ambos tuvieron una concentración máxima de luteína aproximadamente igual. Pero al comparar los tratamientos LA alta, LA pulsos y LA baja (de igual masa total de N a LA alta) se pudo constatar que los dos primeros tuvieron una concentración máxima de luteína mayor al del último tratamiento mencionado. Por lo tanto, se puede inferir que en lote alimentado, al implementar el cultivo con una concentración de N superior, resultó en una mayor concentración volumétrica máxima de luteína. Por lo tanto, en los tratamientos en lote alimentado implementados con la misma masa total de N, incrementar la concentración de N mantenida 3.4 veces, produjo un aumento de 1.65 veces en la concentración máxima de luteína.

Generalmente se considera la luz como el factor limitante de la producción de pigmentos carotenoides en microalgas. Sin embargo, la irradiación de luz fue la misma para todos los tratamientos en escala laboratorio, es por esto que se piensa que la cantidad de luz irradiada no pudo haber sido el único factor que afectara la producción de luteína de ningún tratamiento, debido a que la concentración celular de LA alta fue superior a los demás tratamientos. Los resultados indican que la interacción de luz y nutrientes son los factores a considerar.

En los datos mostrados en la tabla 14 se puede observar que la concentración volumétrica máxima de luteína fue superior en los tratamientos LA

alta y LA pulsos. A partir de un análisis de varianza de los dos tratamientos mencionados, se pudo constatar que no hubo diferencia significativa entre los mismos. Debido a esto se decidió que los tratamientos implementados en escala piloto fueran alimentados por pulsos, debido a que la alimentación mediante pulsos es más sencilla.

Por otra parte, al implementar el cultivo por lote alimentado en escala piloto en condiciones controladas (LAG), se obtuvo una concentración volumétrica de luteína menor y fue 67.1% de la cantidad obtenida en escala laboratorio. Esta cantidad menor obtenida en escala piloto también requirió de 5 días adicionales para ser obtenida, en comparación con el cultivo en escala laboratorio. De la misma forma, al implementar el cultivo por lote alimentado en escala piloto a la intemperie se obtuvo una cantidad menor que fue 87.55% de la cantidad obtenida en escala piloto en condiciones controladas. Por lo que el implementar el cultivo a la intemperie tuvo un efecto negativo sobre la concentración volumétrica de luteína.

Algunos autores especulan que las proteínas intracelulares pueden ser degradadas y usadas como fuente de nitrógeno para mantener las funciones metabólicas. También proponen la idea de que eso explicaría el por qué las concentraciones de pigmentos son bajas durante el inicio y final del cultivo, mientras que los valores máximos de concentración de pigmentos se alcanzan durante la fase de crecimiento exponencial (Xie *et al.*, 2013; Dineshkumar *et al.*, 2015).

#### **6.5.5. Contenido específico de luteína**

En cuanto al contenido específico de luteína (Tabla 15), se pudo observar la misma tendencia de los resultados sin importar el estándar de referencia usado.

En cultivo por lote, al aumentar la concentración inicial de N aumenta el contenido específico de luteína. Por lo que se puede decir que el tratamiento Lote alta fue el mejor tratamiento en cultivo por lote. El tratamiento de Lote alta presentó un contenido específico de luteína que fue 4.5 y 1.63 veces superior al obtenido en Lote baja y Lote media, respectivamente. Lo anterior indica que el contenido específico de luteína en cultivo por lote es directamente proporcional a la concentración inicial de N empleada, debido a que aumentar aproximadamente 4

veces la concentración inicial de N resultó en un aumento de 4.5 veces en el contenido específico de luteína.

**Tabla 15.** Contenido específico máximo de luteína determinado a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.

Escala	Tratamiento	Contenido específico de luteína (mg/g biomasa)		
		Estándar de referencia		
		Luteína (concentración calculada a partir de coeficiente de extinción)	Luteína (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)	Cantaxantina (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)
Laboratorio	Lote baja	1.7021 (10)	1.1457 (10)	0.9655 (10)
	Lote media	4.0768 (10)	2.7115 (10)	2.6749 (10)
	Lote alta	6.3573 (10)	4.209 (10)	4.3839 (10)
	LA baja	9.1972 (10)	6.0971 (10)	6.2542 (10)
	LA media	9.2818 (15)	6.1669 (15)	6.1596 (15)
	LA alta	9.64 (15)	6.3706 (15)	6.7787 (15)
	LA baja igual masa total a LA alta	6.2501 (10)	4.138 (10)	4.3100 (10)
	LA pulsos	12.7722 (10)	8.4585 (10)	8.7813 (10)
Piloto	LAG	11.6288 (10)	7.7321 (10)	7.6528 (10)
	LAGE	13.6172 (15)	9.0126 (15)	9.4229 (15)

( ) día de máximo contenido de luteína

Por otra parte, en los tratamientos en lote alimentado LA baja, LA media y LA alta, el contenido específico de luteína fue de 1.4-1.5 veces superior al del tratamiento Lote alta. En todos los tratamientos en lote alimentado se presentó un contenido específico de luteína significativamente ( $p=0.05$ ) superior al de Lote alta, con excepción del tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta), el cual

tuvo un contenido específico de luteína aproximadamente igual al de Lote alta. Debido a que el contenido específico de luteína de los tratamientos LA baja, LA media y LA alta fue muy similar, se puede decir que la cantidad de masa total de N no tiene ningún efecto sobre el contenido específico de luteína en lote alimentado.

El máximo contenido específico de luteína se obtuvo entre los días 10-15 de cultivo, independientemente del modo de cultivo, de la concentración inicial de N, de la concentración de N mantenida en lote alimentado y de la escala.

Es importante resaltar que LA alta y LA pulsos, fueron los tratamientos que presentaron la mayor magnitud en el contenido específico de luteína de todos los tratamientos en escala laboratorio, por lo que se puede afirmar que implementar lote alimentado con una alta concentración de N mantenida en el medio favorece una mayor acumulación de luteína en la biomasa. En LA pulsos se obtuvo un contenido de luteína 1.3 veces superior al observado en LA alta.

Asimismo, en los tratamientos en escala piloto implementados tanto en condiciones controladas de laboratorio como a la intemperie, también se observaron contenidos específicos de luteína superiores al observado en el tratamiento LA alta.

En el tratamiento en escala piloto en condiciones controladas (LAG), se obtuvo un contenido específico de luteína menor al del tratamiento LA pulsos, siendo 87.1% de lo obtenido en este último. Pero en el tratamiento en escala piloto a la intemperie en verano (LAGE) se obtuvo un contenido de luteína 7.3% mayor con respecto al del tratamiento LA pulsos. Esto nos indica que la iluminación superior que se presenta a la intemperie favorece la mayor acumulación de luteína, ya que en el tratamiento implementado a la intemperie fue donde se obtuvo el mayor contenido de luteína de todos los tratamientos.

También se realizó una verificación del contenido de luteína en una muestra de cultivo en la cual se obtuvo un contenido de 9.3 mg de luteína/g peso seco. Este resultado es superior al reportado para otras especies de microalgas consideradas como altamente productoras de luteína (Tabla 16).

El efecto positivo que se observa sobre el contenido específico de luteína al implementar el cultivo a la intemperie, puede deberse a que la geometría y los

materiales empleados en el fotobiorreactor en escala piloto provocaron condiciones de iluminación diferentes dentro del fotobiorreactor a las que se presentaron dentro del fotobiorreactor en escala laboratorio. El diseño y materiales del fotobiorreactor favorecieron ciclos de luz/oscuridad durante el movimiento del cultivo por el fotobiorreactor, y al presentarse a la intemperie una mayor iluminación aunada al diseño específico del fotobiorreactor empleado, dieron como resultado que aumentara la acumulación de pigmentos a la intemperie.

**Tabla 16.** Contenido específico de luteína de diferentes especies de microalgas en diferentes sistemas de cultivo.

Microalga	Condiciones de cultivo	Contenido de luteína (mg/gPS)	Ref.
<i>Muriellopsis</i> sp.	Laboratorio	4.3	a
	Laguna abierta de 100L	4 – 6	b
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Sistema de 4000L en modo continuo en invernadero	4.5	c
<i>Desmodesmus</i> sp.	Sistema de 4L operando en lote alimentado	5.5	d
<b><i>Scenedesmus incrasatulus</i></b>	Sistema de 2L escala laboratorio en condiciones controladas operado en lote	<b>8.7</b>	<b>Este trabajo (verificado con estandar de cantaxantina a 474nm)</b>
	Sistema de 40L operando en lote alimentado	<b>9.3</b>	

<sup>a</sup>Del Campo *et al.*, 2001; <sup>b</sup>Blanco *et al.*, 2007; <sup>c</sup>Fernández-Sevilla *et al.*, 2010; <sup>d</sup>Xie *et al.*, 2013.

### 6.5.6. Productividad de luteína

Las hipótesis planteadas para este proyecto de doctorado se hicieron en base a la productividad volumétrica de luteína. Aunque también se ha determinado la productividad de luteína por unidad de área. Es importante dejar en claro que la tendencia de los resultados de productividad volumétrica de luteína no se vio afectada por el estándar de referencia empleado para los cálculos. La discusión de los datos se centrará en el estándar de cantaxantina usado debido a que cuando se utilizó el estándar de luteína no se obtuvo el mismo tiempo de retención porque la

columna ya estaba degradada. La productividad volumétrica de luteína de los diferentes tratamientos se muestra en la tabla 17 y la productividad por unidad de área en la tabla 18.

En cultivo por lote, la magnitud de la productividad de luteína del tratamiento Lote alta fue de 0.55 mg/(L d) (Tabla 17). Esta magnitud fue 8 y 2.5 veces superior a la de los tratamientos Lote baja y Lote media, respectivamente. Es decir, el aumento en la concentración inicial de N resultó en un aumento en la productividad de luteína. Aumentar la concentración inicial de N de 24 a 41 mg/L resultó en un aumento en la productividad de 3.1 veces, pero al incrementar la concentración inicial de N de 41 a 82 mg/L se obtuvo un aumento de sólo 2.5 veces en la productividad de luteína. Por lo tanto, no sería recomendable aumentar la concentración inicial de N en cultivo por lote ya que se tiene una tendencia en la que un aumento en la concentración inicial de N producirá un aumento cada vez menor en la productividad de luteína.

En cultivo por lote alimentado se observó que la productividad volumétrica de luteína fue casi 2 veces mayor en LA alta que en LA media y LA baja.

De los tratamientos en lote alimentado en escala laboratorio, sobresalieron LA alta y LA pulsos con una productividad de luteína de 0.78 y 0.92 mg/(L d), respectivamente. O en otras palabras, sobresalieron los tratamientos que tuvieron la mayor concentración inicial de N, mayor masa de total de N y la mayor concentración de N mantenida en el medio. Los resultados de productividad volumétrica de luteína de los tratamientos LA alta y LA pulsos fueron 1.4 y 1.68 veces superiores a la del tratamiento Lote alta. Esto nos indica que el lote alimentado favoreció una mayor productividad volumétrica de luteína en comparación con cultivo por lote. Además, la productividad en lote alimentado se mantuvo durante un periodo de tiempo más prolongado, ya que en cultivo por lote alimentado las productividades se mantienen altas durante 15 días, mientras que en cultivo por lote las productividades sólo se mantienen durante 10 días. Esto último nos indica que se produce más luteína durante más tiempo al implementar cultivo por lote alimentado.

Al comparar los resultados de la productividad volumétrica de luteína de los tratamientos LA alta, LA pulsos y LA baja (de igual masa total de N a LA alta), se puede observar que los dos primeros tratamientos presentaron una productividad mayor. A partir de estos resultados se puede afirmar que mantener una mayor concentración de N en el medio tiene el efecto de aumentar la productividad volumétrica de luteína. Como todos estos tratamientos tuvieron la misma masa total de N, se puede decir que la misma no tiene efecto alguno sobre la productividad, ya que de lo contrario todos estos tratamientos deberían tener una productividad de luteína equivalente.

**Tabla 17.** Productividad volumétrica de luteína determinado a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.

Escala	Tratamiento	Productividad volumétrica de luteína (mg/L d)		
		Estándar de referencia		
		Luteína (concentración calculada a partir de coeficiente de extinción)	Luteína (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)	Cantaxantina (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)
Laboratorio	Lote baja	0.1199	0.0905	0.0687
	Lote media	0.3240	0.2251	0.2146
	Lote alta	0.7724	0.5097	0.5506
	LA baja	0.4880	0.3236	0.3304
	LA media	0.6857	0.4544	0.4691
	LA alta	1.0984	0.7248	0.7846
	LA baja igual masa total a LA alta	0.4229	0.2789	0.3040
	LA pulsos	1.2892	0.8502	0.9268
Piloto	LAG	0.9917	0.6593	0.6527
	LAGE	0.5475	0.3629	0.3727

Para facilitar la comparación de los resultados, todas las productividades corresponden a un periodo de 10 días de cultivo.

En los tratamientos en escala piloto en condiciones controladas LAG y a la intemperie LAGE, se obtuvo una productividad volumétrica de luteína menor a la obtenida en el tratamiento LA pulsos implementado en escala laboratorio. Por lo tanto, el escalamiento tuvo un efecto negativo sobre la productividad volumétrica de luteína ya que el tratamiento LAG presentó una productividad de luteína que fue de una magnitud 70% a la obtenida en LA pulsos. Mientras que la magnitud de la productividad de luteína a la intemperie fue 57% de la obtenida en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio.

En otros estudios publicados en la literatura, reportan productividades volumétricas de luteína en un rango de entre 0.44 - 4.77 mg/(L d) (Xie *et al.*, 2013), por lo que se puede afirmar que los resultados obtenidos en este estudio se encuentran dentro de lo reportado para otras especies de microalgas. Para el caso de un estudio en lote alimentado sobre la cepa *Desmodesmus* sp. se han reportado productividades de 3.56 mg/(L d), utilizando lote alimentado con N y con CO<sub>2</sub> bajo demanda. Es por esto que se piensa que la productividad de la cepa *Scenedemus incrasatulus* debe seguir estudiándose con alimentación de N y uso de CO<sub>2</sub>, con el objetivo de alcanzar las productividades reportadas para otras especies de microalgas.

Los resultados de productividad volumétrica de luteína obtenidos en este estudio indican que al igual que la cepa puede adaptarse a la irradiación de luz, adaptación que se denomina “historial de luz” (Grobbelaar, 2000 y 2010), también puede existir un “Historial de N”, es decir, que la cepa se adapta a las concentraciones de N en el medio y que la respuesta posterior depende de lo que se ha denominado de manera análoga “Historial de N”, esto último concuerda con lo reportado por Hong *et al.* (2011), quienes establecieron que la actividad enzimática de microalgas puede reflejar la concentración previa de N en el medio, en lugar de la presente, y el nitrógeno es almacenado en forma de nitrato que después es usado para la síntesis de macromoléculas, en nuestro caso las macromoléculas sintetizadas pueden ser en su mayoría las relacionadas al crecimiento y división celular, así como las relacionadas con la fotosíntesis que requieren de pigmentos para su correcto funcionamiento.

La productividad de luteína por unidad de área (Tabla 18) mostró en la escala laboratorio la misma tendencia que la productividad volumétrica de luteína.

Pero en escala piloto la productividad de luteína por unidad de área fue superior, teniendo una magnitud máxima de 252.27 mg/(m<sup>2</sup> d) y dependió en mayor parte de la distribución geométrica del fotobiorreactor, la cual fue tubular vertical. La disposición de fotobiorreactor tubular de manera vertical, albergando un mayor volumen en un área menor, tuvo como consecuencia que la productividad de luteína por unidad de área en escala piloto fuera 1.3 veces mayor en comparación con la escala laboratorio.

**Tabla 18.** Productividad de luteína por unidad de área determinada a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.

		Productividad de luteína por unidad de área (mg/m <sup>2</sup> d)		
		Estandar de referencia		
Escala	Tratamiento	Luteína (concentración calculada a partir de coeficiente de extinción)	Luteína (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estandar)	Cantaxantina (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estandar)
Laboratorio	Lote baja	24.4248	18.4357	13.9948
	Lote media	66.002	45.8551	43.7161
	Lote alta	157.3456	103.8309	112.1627
	LA baja	99.4104	65.9205	67.3057
	LA media	139.6839	92.5658	95.5603
	LA alta	223.7550	147.6490	159.8308
	LA baja igual masa total a LA alta	86.1489	56.8147	61.9278
	LA pulsos	262.6229	173.1942	188.8086
	Piloto	LAG	383.3019	254.8260
LAGE		211.6142	140.2644	144.0522

Esto nos indica que se puede aumentar la productividad de luteína por unidad de área aumentando el tamaño del fotobiorreactor de manera vertical, pero esta

estrategia puede generar una mayor presión de la columna de agua que se encuentre contenida en el fotobiorreactor, lo que puede, a su vez, repercutir en los costos de los materiales de construcción y en la potencia necesaria para lograr la aireación del cultivo. Esto nos brinda un incentivo para diseñar y operar fotobiorreactores con alta productividad de biomasa y eficiencia de conversión de luz. En futuros diseños de deben considerar los factores que pueden afectar el desempeño de los fotobiorreactores, como el tipo de fotobiorreactor, medio de cultivo, temperatura, pH, cepa a usar, transferencia de masa de CO<sub>2</sub> y acumulación de O<sub>2</sub>, mezclado, intensidad de iluminación y ciclos de luz/oscuridad. Entre estos factores, los principales que limitan el crecimiento de microalgas son la disponibilidad de luz y la transferencia de masa dentro del fotobiorreactor (Gao *et al.*, 2015).

Considerando el mismo volumen de operación, un reactor operando en lote alimentado produciría una mayor cantidad de luteína que un cultivo operando en lote en el mismo periodo de tiempo. O dicho de otra forma, un reactor operando en cultivo por lote con el doble del volumen produciría la misma cantidad de luteína que un reactor operando en cultivo por lote alimentado, si y sólo si su diseño es vertical como el usado en este estudio.

#### **6.5.7. Productividad de xantofilas totales**

Antes de empezar con la discusión de la productividades volumétricas de xantofilas totales, es importante dejar en claro que las mismas son aproximaciones, ya que se determinaron a la longitud de onda de máxima absorción de la luteína, y debido a que entre las xantofilas totales se encuentran pigmentos cuya longitud de onda de máxima de absorción no corresponde con la de luteína, por lo que no se puede determinar de manera exacta el contenido de estos pigmentos con la metodología empleada y la concentración de los mismos puede estar subestimada. Aún así, las cantidades mostradas pueden ser consideradas como una buena aproximación del valor real.

En la tabla 19 se puede observar que en cultivo por lote la magnitud de la productividad de xantofilas del tratamiento Lote alta fue 0.793 mg/(L d), la cual fue

mayor 6.7 veces a la de Lote baja y 2.2 veces a la de Lote media. Esto nos indica que la productividad volumétrica de xantofilas totales fue mayor en Lote alta que en los tratamientos Lote media y Lote baja. Es decir que aumentar la concentración inicial de N en cultivo por lote resultó en un aumento de la productividad de xantofilas totales; sin embargo, el aumento fue cada vez menor a medida que se aumentó la concentración inicial de N.

**Tabla 19.** Productividad volumétrica de xantofilas determinada a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina como referencia.

Escala	Tratamiento	Productividad volumétrica de xantofilas totales (mg/L d)	
		Estándar de referencia	
		Luteína (concentración calculada a partir de coeficiente de extinción)	Cantaxantina (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)
Laboratorio	Lote baja	0.3013	0.1176
	Lote media	0.6732	0.3594
	Lote alta	1.3111	0.793
	LA baja	0.5754	0.3933
	LA media	1.0056	0.6038
	LA alta	1.8858	1.2945
	LA baja igual masa total a LA alta	0.7447	0.4946
	LA pulsos	1.7561	1.2319
Piloto	LAG	1.6611	1.0545
	LAGE	0.9498	0.5787

En lote alimentado, los tratamientos LA alta y LA pulsos fueron los que presentaron las mayores magnitudes de productividad volumétrica de xantofilas, 1.29 y 1.23 mg/(L d), respectivamente. Es importante señalar que entre los valores de productividad volumétrica de xantofilas y luteína de los tratamientos LA alta y LA pulsos, no hubo una diferencia significativa, y que los valores que presentaron estos tratamientos fueron desde 1.6 hasta 11 veces superiores a los de otros tratamientos

en escala laboratorio de este estudio. Esto nos confirma que en lote alimentado los tratamientos que tuvieron la mayor concentración inicial de N, mayor masa de total de N y la mayor concentración de N mantenida en el medio fueron los que presentaron las productividades más altas.

Sin embargo, al comparar la productividad de xantofilas de los tratamientos LA alta, LA pulsos y LA baja (con igual masa alimentada de N), se hace evidente que la masa total de N no tuvo efecto. Los tratamientos LA alta y LA pulsos tuvieron una productividad de 2.5-2.61 veces superior a los de LA baja (de igual masa total de N a LA alta). Estos resultados indican que la productividad volumétrica de xantofilas en lote alimentado se encuentra relacionada con la concentración inicial de N y con la concentración de N mantenida en el medio.

A escala piloto en condiciones controladas, el tratamiento LAG presentó una productividad volumétrica de xantofilas de una magnitud de 81.4% de la productividad volumétrica observada en el tratamiento LA alta. Esto nos indica que el escalamiento tuvo un efecto negativo sobre la productividad volumétrica de xantofilas. En escala piloto implementado a la intemperie (LAGE), también se vio afectado negativamente ya que fue de una magnitud de 55% de la obtenida en el tratamiento LAG.

Por otra parte, la productividad de xantofilas por unidad de área (Tabla 20) en escala laboratorio presentó las mismas tendencias mencionadas para la productividad volumétrica de xantofilas.

La productividad de luteína por unidad de área de la cepa *Scenedemus incrassatulus* es comparable en magnitud con la reportada para las cepas consideradas altamente productoras, *Muriellopsis* sp. y *Scenedemus almeriensis* (Tabla 21). A partir de estos resultados puede afirmarse que la cepa *Scenedemus incrassatulus* es altamente productora de luteína.

Es decir, aumentar la concentración inicial de N resultó en un aumento de la productividad de xantofilas totales por unidad de área, en cultivo por lote. En lote alimentado la productividad por unidad de área se encuentra relacionada con la

concentración inicial de N y con la concentración de N mantenida en el medio, teniendo la masa total de N un efecto nulo.

**Tabla 20.** Productividad de xantofilas por unidad de área determinada a partir de los cromatogramas utilizando estándar de luteína y de cantaxantina.

		Productividad de xantofilas totales por unidad de área (mg/m <sup>2</sup> d)	
		Estándar de referencia	
Escala	Tratamiento	Luteína (concentración calculada a partir de coeficiente de extinción)	Cantaxantina (concentración calculada a partir de concentración estipulada por el fabricante del estándar)
Laboratorio	Lote baja	61.3778	23.9562
	Lote media	137.1375	73.2133
	Lote alta	267.0841	161.5420
	LA baja	117.2147	80.1191
	LA media	204.8507	123.0001
	LA alta	384.1563	263.7025
	LA baja igual masa total a LA alta	151.7028	100.7549
	LA pulsos	357.7351	250.9503
Piloto	LAG	642.0317	407.5747
	LAGE	367.1071	223.6733

**Tabla 21.** Productividad por unidad de área de luteína de diferentes especies de microalgas y sistemas de cultivo.

Microalga	Productividad de luteína (mg m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	Comentario	Ref.
<i>Muriellopsis</i> sp.	180	Intemperie, sistema tubular, sistema continuo, 55 L	A
	100	Intemperie, tanque abierto, semicontinuo, 100 L	B
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	290	Invernadero, sistema tubular, sistema continuo, 4000 L	C
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	112.16	Condiciones de laboratorio, sistema tubular, lote, 2L	Este trabajo (productividades calculadas empleando estándar de cantaxantina como referencia)
	188.8	Condiciones de laboratorio, sistema tubular, lote alimentado 2L	
	252.27	Condiciones de laboratorio, lote alimentado, escala piloto (40L)	
	114	Intemperie, lote alimentado, escala piloto (40L)	

<sup>a</sup>Del Campo *et al.*, 2001; <sup>b</sup>Blanco *et al.*, 2007; <sup>c</sup>Fernández-Sevilla *et al.*, 2010.

Asimismo, en escala piloto la productividad de xantofilas totales por unidad de área del tratamiento LAG fue de 407.57 mg/(m<sup>2</sup> d), y fue superior a la de los tratamientos en escala laboratorio, gracias al diseño vertical del fotobiorreactor empleado.

Las productividades de xantofilas por unidad de área de los tratamientos LA alta y LA pulsos presentaron magnitudes de 263.7 y 250.9 mg/(m<sup>2</sup> d), respectivamente. Pero la productividad de xantofilas por unidad de área en la escala piloto en condiciones controladas de laboratorio fue 54% mayor a las anteriormente mencionadas. Esto nos indica que la productividad de xantofilas por unidad de área fue favorecida por el diseño tubular vertical. Sin embargo, al implementar el cultivo en escala piloto a la intemperie se vio un efecto negativo sobre la productividad de xantofilas por unidad de área, siendo su magnitud 55% de la obtenida en condiciones controladas.

#### **6.5.8. Productividad de carotenoides totales extraídos con acetona**

Al calcular las productividades de carotenoides totales, volumétrica y por unidad de área (Tabla 22), extraídos empleando acetona al 100%, se pudo verificar que las tendencias discutidas en las secciones anteriores para luteína y xantofilas totales se mantuvieron. Es decir, sin importar la metodología de extracción empleada, los comportamientos fueron los mismos. Aumentar la concentración inicial de N en cultivo por lote resultó en un aumento de la productividad de carotenoides totales, tanto volumétrica como por unidad de área. En lote alimentado en escala laboratorio, la productividad se encuentra relacionada principalmente con la concentración inicial de N y con la concentración de N mantenida en el medio, no presentando la masa total de N efecto sobre las productividades de carotenoides totales.

Asimismo, la productividad de carotenoides totales por unidad de área en la escala piloto en condiciones controladas de laboratorio fue 1.74 veces mayor a la máxima obtenida en escala laboratorio. Lo cual confirma que la productividad de carotenoides totales por unidad de área se ve favorecida por el diseño tubular vertical.

Al implementar el cultivo en escala piloto a la intemperie se vio un efecto negativo sobre la productividad de carotenoides totales por unidad de área, siendo su magnitud 65% de la obtenida en condiciones controladas. Por último, la productividad de carotenoides totales fue superior en aproximadamente un 50% en verano que en otoño.

**Tabla 22.** Productividad máxima de carotenoides totales, volumétrica y por unidad de área determinada a partir de las extracciones con acetona

Escala	Tratamiento	Productividad volumétrica de carotenoides totales (mg/L d)	Productividad de carotenoides totales por unidad de área (mg/m <sup>2</sup> d)
Laboratorio	Lote baja	0.5751	117.1536
	Lote media	0.6616	134.7745
	Lote alta	0.6913	140.8247
	LA baja	0.6315	128.6428
	LA media	0.6960	141.7821
	LA alta	0.7930	161.5420
	LA baja igual masa total a LA alta	0.6118	124.6297
	LA pulsos	0.8482	172.7868
Piloto	LAG	0.7981	308.4736
	LAGE	0.4798	185.4474
	LAGEO	0.2297	88.7813

Aunque existen algunas diferencias en las magnitudes de las productividades, se puede llegar a las mismas conclusiones, lo cual es de suma importancia y hace robustos los resultados y conclusiones encontradas en este trabajo, debido a que las tendencias de los resultados no dependen de la metodología de extracción.

### **6.6. Rendimientos de biomasa y pigmentos con respecto a nitrógeno y fósforo.**

Para comparar la cantidad de biomasa o producto generada en los diferentes modos de cultivo, escalas y en condiciones controladas contra las condiciones a la

intemperie, resulta útil calcular los rendimientos en base a nitrógeno y fósforo, que para biomasa se denominan  $Y_{X/P}$  y  $Y_{X/N}$ .

La acumulación de nutrientes en la biomasa afecta los rendimientos con respecto a N y fósforo. Los rendimientos de biomasa se presentan en la tabla 23. Para la mejor comparación de los rendimientos de biomasa obtenidos en cultivo por lote, se calcularon al día 10 de cultivo para todos los tratamientos, cuando los rendimientos fueron máximos. Mientras que en cultivo por lote alimentado fueron calculados al final del tiempo de cultivo.

**Tabla 23.** Rendimientos de biomasa con respecto a nitrógeno y fósforo de *Scenedesmus incrassatulus* en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie.

Escala	Tratamiento	Rendimientos de biomasa	
		$Y_{X/P}$ (g biomasa/ gP)	$Y_{X/N}$ (g biomasa/ gN)
Laboratorio	Lote baja	129.67	31.72
	Lote media	140.4	19.73
	Lote alta	228.42	15.7
	LA baja	70.38	15.19
	LA media	57.49	11.55
	LA alta	114.43	20.11
	LA baja de igual masa total de N a LA alta	81.07	17.51
	LA pulsos	103.03	17.57
Piloto	LAG	89.26	14.77
	LAGE	35.89	7.12
	LAGEO	53.30	8.47

En cultivo por lote, el aumento de la concentración inicial de N resultó en un decremento en del  $Y_{X/N}$ . Al contrario, el aumento en la concentración inicial de N incrementó el  $Y_{X/P}$ , esto significa que el  $Y_{X/P}$  es afectado por la concentración inicial de N. Los resultados de rendimientos de biomasa se encuentran en concordancia con reportes previos donde se estableció que el mínimo contenido de P en la biomasa resulta en el máximo rendimiento ( $Y_{X/P}$ ) (Wu *et al.*, 2012). El cultivo por lote

tuvo valores más altos de  $Y_{X/P}$ , es decir, en este modo de cultivo se logra un mejor aprovechamiento del fósforo del medio. Los resultados indican que en cultivo por lote debe existir una concentración de N y P óptimas, en las que se pueden obtener altos rendimientos para ambos nutrientes.

En cultivo por lote alimentado, en el tratamiento LA alta se obtuvieron los mayores valores de rendimientos,  $Y_{X/P}$  y  $Y_{X/N}$ . No hubo una tendencia clara de los rendimientos en el modo de cultivo por lote alimentado, debido a que el tratamiento LA media presentó valores inferiores de  $Y_{X/P}$  y  $Y_{X/N}$  a los obtenidos en el tratamiento LA baja.

Sin embargo, comparando los rendimientos del tratamiento LA baja contra los de LA alta y LA pulsos observamos que aumentar la concentración de N resultó en un aumento de  $Y_{X/P}$  y  $Y_{X/N}$ , y no sólo de  $Y_{X/P}$  como en cultivo por lote. Ahora comparando los tratamientos LA alta, LA pulsos y LA baja (de igual masa total de N), observamos que aunque  $Y_{X/P}$  es menor en el último tratamiento mencionado, el  $Y_{X/N}$  es similar en magnitud al del tratamiento LA pulsos, es decir el  $Y_{X/N}$  no disminuye al usar una concentración mayor de N en el medio y utilizar la misma masa total de N. Finalmente, en lote alimentado se obtienen  $Y_{X/P}$  inferiores a los obtenidos en cultivo por lote. Pero los resultados indican que ambos rendimientos,  $Y_{X/P}$  y  $Y_{X/N}$ , pueden aumentarse simultáneamente al emplear cultivo por lote alimentado.

Los rendimientos de biomasa obtenidos en escala piloto en condiciones controladas (LAG) fueron inferiores,  $Y_{X/P}$  fue 13.3% menor y  $Y_{X/N}$  fue 16% menor a los obtenidos en el tratamiento LA pulsos. Aún así, se puede afirmar que los rendimientos en la escala piloto (LAG) fueron altos y similares en magnitud a los de los tratamientos LA baja y LA alta (de igual masa total de N a LA alta).

Por último, los rendimientos de los tratamientos que se realizaron a la intemperie fueron los menores de todos los tratamientos, lo que nos indica que las condiciones variables de temperatura e irradiación de luz de la intemperie tienen un efecto negativo sobre los rendimientos de biomasa,  $Y_{X/P}$  y  $Y_{X/N}$ .

En cuanto a los rendimientos de pigmentos, clorofila *a* (tabla 24), clorofila *b* (tabla 25) y carotenoides totales (tabla 26), mostraron algunas tendencias diferentes que el rendimiento de biomasa. En el caso de los rendimientos de la clorofila *a* en cultivo por lote, tanto el rendimiento en base a fósforo ( $Y_{Chl\ a/P}$ ) como el rendimiento en base a nitrógeno ( $Y_{Chl\ a/N}$ ), aumentan al aumentar la concentración inicial de N del medio.

**Tabla 24.** Rendimientos de clorofila *a* con respecto a nitrógeno y fósforo de *Scenedesmus incrassatulus* en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie.

Escala	Tratamientos	Rendimientos de clorofila <i>a</i>	
		$Y_{Chl\ a/P}$ (g clorofila <i>a</i> / gP)	$Y_{Chl\ a/N}$ (g clorofila <i>a</i> / gN)
Laboratorio	Lote baja	0.55	0.136
	Lote media	1.14	0.161
	Lote alta	2.24	0.195
	LA baja	1.14	0.250
	LA media	0.83	0.168
	LA alta	1.46	0.250
	LA baja de igual masa total de N a LA alta	1.60	0.378
	LA pulsos	1.22	0.210
Piloto	LAG	1.94	0.322
	LAGE	1.11	0.247
	LAGEO	0.55	0.088

Sin embargo, en lote alimentado al comparar los resultados de los tratamientos LA baja con LA alta se observa que al aumentar la concentración de N mantenida en el medio aumentó únicamente el rendimiento en base a fósforo ( $Y_{Chl\ a/P}$ ), mientras que el rendimiento en base a nitrógeno ( $Y_{Chl\ a/N}$ ) permaneció sin cambios. Los mayores valores de  $Y_{Chl\ a/P}$  y  $Y_{Chl\ a/N}$  se obtuvieron en el tratamiento LA baja (de igual masa total de N a LA alta), esto nos indica que los rendimientos de clorofila *a* son independientes de la masa total de N y de su concentración en

lote alimentado, ya que de lo contrario se esperaría que los tratamientos LA alta y LA pulsos tuvieran los mayores rendimientos.

El escalamiento del cultivo tuvo un efecto positivo sobre los rendimientos en base a fósforo y nitrógeno,  $Y_{Chl\ a/P}$  y  $Y_{Chl\ a/N}$ , debido a que en el tratamiento LAG se se obtuvieron mayores rendimientos que en los tratamientos en escala laboratorio. Sin embargo, al implementar el cultivo a la intemperie hubo un efecto negativo sobre los rendimientos de clorofila *a*, pero este efecto negativo fue mayor en otoño que en verano.

El rendimiento de clorofila *b* (Tabla 25) con respecto a fósforo,  $Y_{Chl\ b/P}$ , en cultivo por lote, aumenta al aumentar la concentración inicial de N del medio. La tendencia del rendimiento  $Y_{Chl\ b/N}$  no es clara debido a que el rendimiento del tratamiento Lote media es menor al de Lote baja y Lote alta.

**Tabla 25.** Rendimientos de clorofila *b* con respecto a nitrógeno y fósforo de *Scenedesmus incrassatulus* en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie.

Escala	Tratamientos	Rendimientos de clorofila <i>b</i>	
		$Y_{Chl\ b/P}$ (g clorofila <i>b</i> / gP)	$Y_{Chl\ b/N}$ (g clorofila <i>b</i> / gN)
Laboratorio	Lote baja	0.42	0.104
	Lote media	0.46	0.065
	Lote alta	1.90	0.131
	LA baja	0.26	0.058
	LA media	0.21	0.042
	LA alta	0.40	0.070
	LA baja de igual masa total de N a LA alta	0.41	0.097
	LA pulsos	0.38	0.064
Piloto	LAG	0.42	0.070
	LAGE	0.29	0.065
	LAGEO	0.22	0.035

En lote alimentado el rendimiento de clorofila *b* con respecto a fósforo ( $Y_{Chl\ b/P}$ ) se incrementa al aumentar la masa total de N y fue mayor en los tratamientos

con la mayor masa total de N empleada. El rendimiento de clorofila *b* con respecto a nitrógeno ( $Y_{Chl\ b/N}$ ) en lote alimentado en escala laboratorio tampoco mostró una tendencia clara y tuvo una mayor magnitud en el tratamiento LA baja (de igual masa total a LA alta).

El rendimiento  $Y_{Chl\ b/P}$  se mantuvo en la escala piloto por lo que el escalamiento no tuvo ningún efecto sobre este rendimiento. Sin embargo, en la escala piloto al implementar el cultivo a la intemperie, el  $Y_{Chl\ b/P}$  disminuye en un 31% en verano y en un 48% en otoño con respecto al cultivo realizado en condiciones controladas. El rendimiento en base a nitrógeno,  $Y_{Chl\ b/N}$ , en lote alimentado en escala laboratorio en condiciones controladas de laboratorio, fue de 0.70, pero al implementar el cultivo a la intemperie hubo una disminución de sólo 7.2% en verano y una de 50% en otoño, por lo que la implementación de cultivo a la intemperie tiene un efecto negativo sobre el  $Y_{Chl\ b/N}$ , pero este efecto negativo es más notorio en otoño.

Por último, pero no por eso menos importante, el rendimiento de carotenoides totales en base a fósforo ( $Y_{Car/P}$ ) en cultivo por lote fue superior al aumentar la concentración inicial de N en el medio. Mientras que el rendimiento de carotenoides totales en base a nitrógeno ( $Y_{Car/N}$ ) mostró una relación inversamente proporcional a la concentración inicial de N en el medio. Es decir, a mayor concentración inicial de N en el medio, menor rendimiento.

En lote alimentado en escala laboratorio, el  $Y_{Car/P}$  fue mayor en los tratamientos LA alta y LA pulsos que tuvieron la mayor concentración de N mantenida en el medio junto con la mayor masa total de N.

El tratamiento en escala piloto en condiciones controladas LAG, presentó un  $Y_{Car/P}$  de igual magnitud al del tratamiento LA alta, por lo que se puede afirmar que el escalamiento no tiene ningún efecto sobre este rendimiento. Nuevamente, la implementación del cultivo a la intemperie tuvo un efecto negativo sobre el  $Y_{Car/P}$ , que fue 28 y 53% en verano y otoño, respectivamente, con respecto al tratamiento LAG.

En lote alimentado en escala laboratorio, el rendimiento de carotenoides totales con respecto a N,  $Y_{Car/N}$ , fue mayor en los tratamientos que tuvieron la mayor masa total de N.

**Tabla 26.** Rendimientos de carotenoides totales con respecto a nitrógeno y fósforo de *Scenedesmus incrassatulus* en diferentes modos de cultivo, escala y en cultivo a la intemperie.

Escala	Tratamientos	Rendimientos de carotenoides totales	
		$Y_{Car/P}$ (g car tot/ gP)	$Y_{Car/N}$ (g car tot/ gN)
Laboratorio	Lote baja	0.97	0.239
	Lote media	1.16	0.163
	Lote alta	1.99	0.137
	LA baja	0.29	0.064
	LA media	0.23	0.046
	LA alta	0.47	0.083
	LA baja de igual masa total de N a LA alta	0.35	0.076
	LA pulsos	0.44	0.075
Piloto	LAG	0.47	0.078
	LAGE	0.34	0.069
	LAGEO	0.22	0.036

En el tratamiento en escala piloto LAG se observó un  $Y_{Car/N}$  similar en magnitud al del tratamiento LA pulsos realizado en escala laboratorio, por lo que se puede afirmar que el escalamiento no afecta el rendimiento de carotenoides totales con respecto a N. Sin embargo, al implementar el cultivo en escala piloto a la intemperie, hubo una disminución del  $Y_{Car/N}$  de 12% en verano y de 54% en otoño, con respecto al rendimiento del tratamiento LAG.

Esto nos permite concluir que todos los rendimientos de biomasa, clorofila y carotenoides totales se ven afectados negativamente por las condiciones cambiantes de luz y temperatura que se presentan a la intemperie.

## 7. CONCLUSIONES

La hipótesis que dice “La productividad volumétrica de luteína de *Scenedesmus incrassatulus* en cultivo por lote alimentado se mantendrá constante al incrementar la escala del cultivo” es falsa. La productividad volumétrica no se mantiene constante al incrementar la escala de cultivo.

La hipótesis que dice “La productividad de luteína de *Scenedesmus incrassatulus* en cultivo por lote alimentado posterior a su escalamiento será superior en condiciones controladas de laboratorio que a la intemperie” es verdadera.

El sistema de cultivo por lote alimentado, permite obtener una mayor cantidad de biomasa comparado con cultivo por lote, tanto en peso seco como en cantidad de células por mililitro.

El efecto de la concentración final de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de pigmentos carotenoides fue nulo.

El nitrógeno no es el factor limitante del crecimiento en lote alimentado, debido a que en este modo de cultivo la velocidad específica de crecimiento es independiente de la concentración mantenida de nitrógeno en el medio.

En cambio, el nitrógeno es limitante en cultivo por lote ya que en este modo de cultivo la velocidad específica de crecimiento aumenta al aumentar la concentración inicial de nitrógeno.

La velocidad de consumo acumulado de nitrógeno aumenta al aumentar la concentración inicial en cultivo por lote.

En cultivo por lote alimentado, la velocidad de consumo acumulado de nitrógeno se incrementó al aumentar la cantidad de masa total de nitrógeno que se suministró al cultivo.

Alimentar nitrógeno al medio de cultivo estabilizó la eficiencia fotosintética máxima en una magnitud cercana a la máxima teórica.

Los valores de NPQ en cultivo por lote alimentado no tienen relación directa con la concentración de luteína y/o de otros pigmentos carotenoides, como neoxantina o violaxantina del ciclo de las xantofilas.

En cultivo por lote alimentado se obtuvieron valores superiores de concentración volumétrica de xantofilas, concentración volumétrica de luteína, contenido específico de luteína, productividad volumétrica de luteína y productividad de luteína por unidad de área que en cultivo por lote.

En lote alimentado aumentar la masa total de nitrógeno y la concentración de nitrógeno en el medio aumenta la concentración volumétrica máxima de luteína.

El perfil de xantofilas de *Scenedesmus incrassatulus* durante el periodo de crecimiento exponencial fue independiente del modo de cultivo y de la escala del mismo.

Los rendimientos de biomasa y carotenoides con respecto a fósforo aumentan al aumentar la concentración inicial de nitrógeno en cultivo por lote.

El rendimiento de biomasa con respecto a nitrógeno disminuye al aumentar la concentración inicial de nitrógeno, en cultivo por lote.

En lote alimentado, al aumentar la concentración inicial y la concentración de nitrógeno mantenida en el medio, aumentan los rendimientos de biomasa y carotenoides totales con respecto a fósforo y nitrógeno.

Los rendimientos obtenidos de biomasa, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en cultivo en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio fueron similares en magnitud a las obtenidas en cultivo implementado en escala laboratorio.

Los rendimientos de clorofila *a* y *b* con respecto a nitrógeno y fósforo, aumentan al aumentar la concentración inicial de N en el medio en cultivo por lote.

Los rendimientos de biomasa, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales de la cepa *Scenedesmus incrassatulus* cultivada en lote alimentado a la intemperie, fueron inferiores a los obtenidos en condiciones controladas.

La cepa *Scenedesmus incrassatulus* es altamente productora de luteína.

## 8. RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación sobre lote alimentado con una metodología exploratoria sobre las posibles variantes de implementación y resultados que hasta el momento se desconocen.
- Secuenciar el genoma de la cepa *Scenedesmus incrassatulus* para establecer relaciones gen/proteína que se expresan en el modo de cultivo de lote alimentado. Entender que partes del genoma de la microalga es de suma importancia para mejorar rendimientos en futuras investigaciones.
- Establecer perfiles proteicos de la cepa *Scenedesmus incrassatulus* para observar cambios relacionados con la implementación de cultivo por lote alimentado. Los perfiles proteicos Entender que partes del genoma de la microalga es de suma importancia para mejorar rendimientos en futuras investigaciones.
- Determinar el efecto de la aplicación de cultivo por lote alimentado sobre otros parámetros de fluorescencia de la clorofila *a*. Se desconoce si algún otro parámetro que no se utilizó en la presente investigación tiene alguna relación con los rendimientos y/o productividad de biomasa y pigmentos
- Continuar la investigación en cultivo a la intemperie. Contar con datos de cultivo a la intemperie durante un tiempo de 2 o más años hace más factible la posible transferencia tecnológica.
- Implementar cultivos de la cepa *Scenedesmus incrassatulus* en invernadero. Los resultados indican que las condiciones controladas tienen mejores rendimientos y productividades de luteína. Pero aún se desconoce en que rango deben de controlarse las variables de luz y temperatura.
- Evaluar diferentes diseños de fotobiorreactores. El diseño vertical de fotobiorreactor implementado es sólo uno de muchos posibles diseños y se desconoce si otros diseños pueden brindar mejores resultados en productividad de biomasa y carotenoides.
- Desarrollar métodos de monitoreo de nutrientes y del cultivo que sean rápidos, poco costosos y sensibles.

## 9. REFERENCIAS

1. Ación F. G., Fernández J. M., Magán J. J., Molina E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30: 1344–1353.
2. Ahlgren G. y Hyenstrand P. (2003). Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*) and *Synechococcus* sp. (*Cyanophyceae*). *J. Phycol.* 39: 906–917.
3. Alves-Rodrigues A. y Shao A. (2004). The science behind lutein. *Toxicol. Lett.* 150: 57–83.
4. Apel K. y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 373-399.
5. Arbib Z., Ruiz J., Alvarez-Diaz P., Garrido-Perez C., Barragan J., Perales J. A. (2013). Photobiotreatment: influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus obliquus*. *International journal of phytoremediation.* 15(8):774-788.
6. Archer D. M. y Barber J. (2004). Molecular to global photosynthesis. Imperial College Press. Singapore. Pp. 764.
7. Asada K. (1996). Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: Baker N. R. (Ed) *Photosynthesis and the Environment*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 123–150.
8. Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601–639.
9. Asada K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 355: 1419–1431.
10. Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in Chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391-396.
11. Baker N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59: 89-113.
12. Barsanti L. y Gualtieri P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Ed. Taylor Francis. Boca Raton, Florida, Estados Unidos de America.
13. Barsanti L. y Paolo G. (2014). *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor Francis Group 361 p. ISBN 9781439867327
14. Barsanti L., Coltelli P., Evangelista V., Frassanito A. M., Vesenti N. y Gualtieri P. (2008). The world of algae. En: Evangelista V., Barsanti L., Frassanito A. M., Passareli V. y

- Gualtieri P. (Eds), Algal toxins: nature occurrence, effect and detection. Springer Science + Business Media B. V. Netherlands, pp 1-16.
15. Barth C., Krause G. H. y Winter K. (2001). Responses of photosystem I compared with photosystem II to high-light stress in tropical shade and sun leaves. *Plant Cell Environ.* 24: 163–176.
  16. Bellafiore S., Barneche F., Peltier G. y Rochaix J.-D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature.* 433: 892–895.
  17. Blanco A. M., Moreno J., Del Campo J. A., Rivas J. y Guerrero M. G. (2007). Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 1259–1266.
  18. Bone R. A., Landrum J. T., Guerra L. H. y Ruiz C. A. (2003). Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. *J. Nutr.* 133: 992-998.
  19. Borowitzka M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393–401.
  20. Boureima S., Oukarroum A., Diouf M., Cisse N., Van Damme P. (2012). Screening for drought tolerance in mutant germplasm of sesame (*Sesamum indicum*) probing by chlorophyll *a* fluorescence. *Environ. Exp. Bot.* 81: 37– 43.
  21. Brandon L. (2008). Promoting Eye and Skin Health Through Intake of the Natural Carotenoid Lutein. En: De Meester F. and Watson. R. R. (Eds). *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention.* Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 331-342.
  22. Broecker W. S. y Henderson G. M. (1998). The sequence of events surrounding Termination II and their implications for the cause of glacial-interglacial CO<sub>2</sub> changes. *Paleoceanography.* 13: 352-364.
  23. Brown L. R. (2009). Could food shortages bring down civilization? *Sci. Am.* 300: 50-57.
  24. Buapet P., Hiranpan R., Ritchie R. J. y Prathep A. (2008). Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat. *ScienceAsia.* 34: 245-252.
  25. Cañizares R. O. y Perales H. (2006). Microalgas. Cultivo y aplicaciones técnicas. *Sci. Am. Spain.* 363: 34-35.
  26. Carpentier S., Knaus M. y Suh M. (2009). Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49: 313-326.

27. Çelekli A., Balci M., y Bozkurt H. (2008). Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresour. Technol.* 99: 8742–8747.
28. Chan M.-C., Ho S.-H., Lee D.-J., Chen C.-Y., Huang C.-C., Chang J.-S. (2012). Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Biochem. Eng. J.* 78: 24-31.
29. Chasan-Taber L., Willett W. C., Seddon J. M., Stampfer M. J., Rosner B., Colditz G. A., Speizer F. E. y Hankinson S. E. (1999). A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 509-516.
30. Choi S. L., Suh I. S. y Lee C. G. (2003). Luminostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. *Enzyme. Microb. Tech.* 33: 403–409.
31. Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R. J. y Défago G. (2007). Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 60: 504–514.
32. Contreras-Flores C., Peña-Castro J. M., Flores-Cotera L. B. y Cañizares-Villanueva R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia.* 28: 450-456.
33. Cordero B. F., Obratsova I., Couso I., Leon R., Vargas M. A. y Rodriguez H. (2011). Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Mar. Drugs.* 9(9): 1607-1624.
34. Cornic G., Bukhov N. G., Weise C., Bligny R. y Heber U. (2000). Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta.* 210: 468–477.
35. Cortés C., M. J. Esteve M. J., Frígola A. y Torregrosa F. (2004). Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2203-2212.
36. Dall'Osto L. Lico C., Alric J. y Giuliano G. (2006). Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHClI antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light. *BMC Plant Biol.* 6: 32.
37. Dau H. y Zaharieva I. (2009). Principles, efficiency, and blueprint character of solar energy conversion in photosynthetic water oxidation. *Acc. Chem. Res.* 42: 1861-1870.

38. De Andrade G.A., Berenguel M., Guzmán J.L., Pagano D.J. y Acién F.G. (2016) Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*. 37:58–69.
39. de Faria F., de Rosso V. V. y Mercadante A. Z. (2009). Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 64: 108–115.
40. De Morais M. G. y Costa J. A. V. (2007). Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol. Lett.* 29: 1349–1352.
41. Del Campo J. A., García-González M. y Guerrero M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1163–1174.
42. Del Campo J. A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M. A., Rivas J. y Guerrero M. G. (2001). Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 81:289–295.
43. Del Campo J. A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M. A., Rivas J. y Guerrero M. G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(6): 848–854.
44. Delgado-Vargas F. y Paredes López O. (1996). Correlation of HPLC and AOAC Methods to Assess the All-trans-Lutein Content in Marigold Flowers. *J. Sci. Food Agric.* 72:283-290.
45. Delgado-Vargas F. y Paredes-López O. (2003). Carotenoids. En: *Natural colorants for foods and nutraceutical uses*, cap. 7. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estados Unidos de America, pp 113-157.
46. Delgado-Vargas F., Jiménez A. R. y Paredes-López. O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3):173-289.
47. DellaPenna D. (1999). Carotenoid synthesis and function in plants: insights from mutant studies in *Arabidopsis thaliana*. En: Frank H. A., Young A. J., Britton G. y Cogdell R. J. (Eds): *The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 21–37.

48. Díaz O. A., Reddy K. R., Moore P. A. J. (1994). Solubility of inorganic phosphorus in stream water as influenced by pH and calcium concentration. *Water Res.* 28(8): 1755-1763.
49. 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 Res.* 7:24–32.
50. Dogaris I., Welch M., Meiser A., Walmsley L., Philippidi G. (2016). A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae. *Bioresour Technol.* 198:316–324.
51. Dunn J. L., Turnbull J. D. y Robinson S. A. (2004). Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of higher plants. *Funct. Plant Biol.* 31: 195 – 202.
52. Dwyer J. H., Navab M., Dwyer K. M., Hassan K., Sun P., Shircore A., Hama-Levy S., Hough G., Wang X., Drake T., Merz N. B. y Fogelman A. M. (2001). Oxygenated carotenoid lutein and the progression of early atherosclerosis. The Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation* 103: 2922–2927.
53. Eixler S., Karsten U. y Selig U. (2006). Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia.* 45(1): 53–60.
54. Endo T. y Asada K. (2008). Photosystem I and Photoprotection: Cyclic Electron Flow and Water-Water Cycle. En: Demmig-Adams B., Adams W. W. III y Mattoo A.K. (Eds), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*, Springer Science+Business Media B.V. Netherlands. Pp. 205–221
55. Eonseon J., Polle J. E. W., Lee H. K., Hyun S. M. y Chang M. (2003). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13 (2): 165–174.
56. Esteban R. y Garcia-Plazaola J. I. (2014). Involvement of a Second Xanthophyll Cycle in Non-Photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence: The Lutein Epoxide Story, in B. Demmig-Adams, G. Garab, W. Adams III, Govindjee (Eds.), *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp. 157-185.
57. Falkowski P.G. (2000). Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *J. Phycol.* 36: 3-6.
58. Falkowski P.G. (2002). El bosque invisible de los océanos. *Sci. Am. Spain.* 313: 22-29.

59. FAO, Food and Agriculture Organization Stat (2007). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
60. Fernández-Sevilla J. M., Ación-Fernández F. G. y Molina-Grima E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (1): 27 – 40.
61. Gale C. R., Hall N. F., Phillips D. I. W. y Martyn C. N. (2001). Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmol.* 108: 1992-1998.
62. Gao X., Kong B. y Vigil R.D. (2015) Characteristic time scales of mixing, mass transfer and biomass growth in a Taylor vortex algal photobioreactor. *Bioresour Technol.* 198:283–291.
63. García-Cañedo J. C. (2009). Obtención de carotenoides a partir de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* empleando cultivo por lote alimentado. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. 100p.
64. García-Cañedo J. C., Cristiani-Urbina E., Flores-Ortiz C. M., Ponce-Noyola T., Cañizares-Villanueva R. O. (2009). Obtención de carotenoides a partir de la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y levaduras..
65. García-Cañedo J. C., Flores-Ortiz C. M., Cañizares-Villanueva R. O. (2011). Carotenoid Profile and Content of the Green Microalgae *Scenedesmus incrassatulus*. *J. Am. Diet. Assoc.* 111(9): A94 Suppl 2.
66. García-Cañedo J.C., Cristiani-Urbina E., Flores-Ortiz C.M., Ponce-Noyola T., Esparza-García F. y 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 Res.* 13:41–52.
67. Geider R. J., MacIntyre H. L. y Kana T. M. (1996). A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1-15.
68. Geider R. y La Roche J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37: 1-17.
69. Genty B, Briantais J. M. y Baker N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.

70. George S. B., Lawrence J. M., Lawrence A. L., Smiley J. y Plank L. (2001). Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*. 199: 353–369.
71. Gilmore A. M. y Yamamoto H. Y. (1991). Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatography column. *J. Chromatogr.* 543: 137-145.
72. Goiris K., Muylaert K., Fraeye I., Foubert I., De Brabanter J., De Cooman L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J. Appl. Phycol.* 24(6): 1477-1486.
73. González S. y Peñalosa C. (2000). *Biomoléculas, métodos de análisis*. 1ª edición Universidad Nacional Autónoma de México, ENEPI. México. Pp. 196.
74. González-Moreno S., Perales-Vela H. y Salcedo-Alvarez M. O. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev.* 27(4): 119-129.
75. Granado F., Olmedilla B. y Blanco I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit. J. Nutr.* 90: 487–502.
76. Greenberg A. E., Clesceri L. S. y Eaton A. D. (1992). *Stándar Methods for the Examination of Water and Wastewater* 18ª edición. APHA, AWWA, WEF. Washington, Estados Unidos.
77. Gris B., Morosinotto T., Giacometti G.M., Bertucco A. y Sforza E. (2014). Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: effects of light intensities and light–dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172:2377–2389.
78. Grobbelaar J. U. (2000). Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* 12: 201-206.
79. Grobbelaar J. U. (2010). Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth. Res.* 106:135–144.
80. Guerri M., Brunel L. y Dauta A. (1981). Interaction de la lumière et de la température sur le taux de croissance de *Scenedesmus crassus*. *Ann. Limnol.* 17: 97–104.
81. Guo W.-H., Tu C.-Y. y Hu C.-H. (2008). Cis-trans isomerizations of  $\beta$ -carotene and lycopene: A theoretical study. *J. Phys. Chem.* 112: 12158–12167.

82. Hadi M. R., Shariati M. y Afsharzadeh S. (2008). Microalgal biotechnology: Carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 13(5): 540-544.
83. Hanson D. T., Franklin L. A., Samuelsson G. y Badger M. R. (2003). The *Chlamydomonas reinhardtii* *cia3* mutant lacking a thylakoid lumen-localized carbonic anhydrase is limited by CO<sub>2</sub> supply to Rubisco and not photosystem II function in vivo. *Plant Physiol.* 132: 2267–2275.
84. Hariskos I. y Posten C. (2014) Biorefinery of microalgae opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnol. J.* 9:739–752.
85. Heber U. (2002). Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynth. Res.* 73: 223–231.
86. Heber U. y Walker D. A. (1992). Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* 100: 1621–1626.
87. Hejazi M. A. y Wijffels R. H. (2004). Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* 22: 189-194.
88. Henriques F. S. (2009). Leaf Chlorophyll Fluorescence: Background and Fundamentals for Plant Biologists. *Bot. Rev.* 75: 249–270.
89. Hewes C.D. (2015). Not all culture is created equal: A comparative study in search of the most productive cultivation methodology. *Algal Res.* 12:561–568.
90. Hong H.-S., Wang Y.-J. y Wang D.-Z. (2011). Response of phytoplankton to nitrogen addition in the Taiwan strait upwelling region: Nitrate reductase and glutamine synthetase activities. *Continental Shelf Res.* 31: S57–S66.
91. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Existencia de gallinas para la producción de huevo según función zootécnica. Cuadro 56.
92. Iwai M., Yokono M., Inada N., y Minagawa J. (2010). Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Plant Biol.* 107(5): 2337-2342.
93. Jans F., Mignolet E., Houyoux P. A., Cardol P., Ghysels B., Cuine S., Cournac L., Peltier G., Remacle C. y Franck F. (2008). A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 20546–20551.
94. Janssen M., Tramper J., Mur L.R. y Wijffels R.H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol. Bioeng.* 81:193–210.

95. Jones J. B. (1998). Plant nutrition manual. CRC press, Boca Raton, USA, pp.148.
96. Kaiser W. (1976). Effect of hydrogen peroxide on CO<sub>2</sub>-fixation of isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 440: 476–482.
97. Kalaji H. M., Carpentier R., Allakhverdiev S. I. y Bosa K. (2012). Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 112: 1–6.
98. Kang C. D., Han S. J., Choi S. P. y Sim S. J. (2010). Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 33: 133–139.
99. Khoo H. E., Prasad K. N., Kong K. W., Jiang Y. y Ismail A. (2011). Carotenoids and their Isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules.* 16: 1710-1738.
100. Kim H. W., Chew B. P., Wong T. S., Park J. S., Weng B. B. C., Byrne K. M., Hayek M. G. y Reinhart G. A. (2000a). Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 331–341.
101. Kim H. W., Chew B. P., Wong T. S., Park J. S., Weng B. B. C., Byrne K. M., Hayek M. G. y Reinhart G. A. (2000b). Dietary lutein stimulates immune response in the canine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74: 315–327.
102. Kim M. K., Park J. W., Park C. S., Kim S. J., Jeune K. H., Chang M. U. y Acreman J. (2007). Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 98: 2220–2228.
103. Kim N. J. y Lee C. G. (2001). A theoretical consideration on oxygen production rate in microalgal cultures. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 6: 352–358.
104. Koh H. H., Murray I. J., Nolan D., Carden D., Feather J. y Beatty S. (2004). Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study. *Exp. Eye. Res.* 79: 21–27.
105. Krinsky N. I., Landrum J. T. y Bone R. A. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 171-201.
106. Krustok I., Odlare M. y Truu J. (2016). Nierenheim Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake. *Bioresour Technol.* 202:238–243.
107. Lababpour A., Shimahara K., Hada K., Kyoui Y., Katsuda T. y Katoh S. (2005). Fed-Batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 339-342.

108. Lee C. G. y Palsson B. O. (1996). Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnol. Progr.* 12: 249–56.
109. Lee R. E. (1992). *Phycology*. Cambridge University Press. Pp. 631.
110. Levin G. V. y Shapiro J. (1965). Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. *J. Water Poll. Control Fed.* 37(6): 800–821.
111. Lichtenthaler H. K. y Wellburn A. R. (1983). Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. *Biol. Soc. Trans.* 11. 591-592.
112. Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X. y Chang W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature.* 428: 287-292.
113. Lodi A., Binaghi L., Solisio C., Converti A. y Del Borghi M. (2003). Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 656–660.
114. Magnuson A., Anderlund M., Johansson O., Lindblad P., Lomoth R., Palivka T., Ott S., Stensjö K., Styring S., Sundström V. y Hammarström L. (2009). Biomimetic and microbial approaches to solar fuel generation. *Acc. Chem. Res.* 42: 1899-1909.
115. Mares-Perlman J. A., Millen A. E., Ficek T. L. y Hankinson S. E. (2002). The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. *Overview. J. Nutr.* 132: 5185–5245.
116. Martínez M. E., Jiménez J. M. y El-Yousfi F. (1999). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorous uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 67: 233–240.
117. Mathur S., Jajoo A., Mehta P. y Bharti S. (2011). Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Biol.* 13: 1-6.
118. Mehler A. H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. 1. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 65–77.
119. Mendes-Pinto M. M., Ferreira A. C. S., Oliveira M. B. P. y De Pinho P. G. (2004). Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed- and normal-phase liquid chromatography: A qualitative analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3182-3188.
120. Menéndez M. Herrera J. y Comín F. A. (2002). Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (O. F. Müll.) Kütz in a Mediterranean coastal lagoon. *Sci. Mar.* 66(4): 355-364.

121. Mimouni V., Ulmann L., Pasquet V., Mathieu M., Picot L., Bougaran G., Cadoret J. P., Morant-Manceau A. y Schoefs B. (2012). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Curr. Pharma. Biotechnol.* 13(15): 2733-2750.
122. Mimuro M. y Akimoto S. (2003). Carotenoids of light harvesting systems: energy transfer processes from fucoxanthin and peridinin to chlorophyll. En: *Photosynthesis in algae, serie Advances in photosynthesis and respiration*. Vol. 14. Larkum A. W. D., Douglas S. E. y Raven J. A. (Eds.). Editorial Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. Pp. 343-344.
123. Morweiser M., Kruse O., Hankamer B. y Posten C. (2010). Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1291–1301.
124. Nakayama M., Miyasaka M., Maoka T., Yagi M. y Fukuta M. (2006). A carotenoid-derived yellow *Eustoma* screened under blue and ultraviolet lights. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75(2): 161-165.
125. Ogawa T. (1991). A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 4275–4279.
126. Olmedilla B., Granado F., Blanco I. y Vaquero M. (2003). Lutein, but not  $\alpha$ -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebocontrolled pilot study. *Nutr.* 19: 21–24.
127. Osmond C. B. y Grace S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 46: 1351–1363.
128. Pagliano C., Saracco G. y Barber J. (2013). Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth Res.* DOI 10.1007/s11120-013-9803-8.
129. Park E. K. y Lee C. G. (2001). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 1024–1030.
130. Peltier G., Tolleter D., Billon E. y Cournac L. (2010). Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynth. Res.* 106:19–31.
131. Perales-Vela H. V. (2008). Caracterización fotosintética y respiratoria de *Scenedesmus incrassatulus* durante la biorremoción de  $\text{Cu}^{2+}$ . Tesis doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. pp 163.

132. Perales-Vela H., Gonzalez Moreno S., Montes-Horcasitas M. C., Cañizares-Villanueva R. O. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sublethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. 67: 2274-2281.
133. Ping B. T. Y. y Gwendoline E. C. L. (2006). Identification of lutein in crude palm oil and evaluation of carotenoids at various ripening stages of the oil palm fruit. *Journal of Oil Palm Research*. 18: 189-197.
134. Pirastru L., Darwish M., Chu F. L., Perreault F., Sirois L., Sleno L. y Popovic R. (2012). Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *J. Appl Phycol*. 24: 117–124.
135. Powell N. Shilton A. Chisti, Y. y Pratt S. (2009). Towards luxury uptake process via microalgae defining the polyphosphate dynamics. *Water Res*. 43(17): 4207–4213.
136. Powell N., Shilton A., Pratt S. y Chisti Y. (2011). Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. *Water Sci. Technol*. 63(4): 704-709.
137. Powell N., Shilton A., Pratt S. y Chisti, Y. (2008). Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environ. Sci. Technol*. 42(16): 5958–5962.
138. Pruvost J., Le Gouic B., Lepine O., Legrand J., Le Borgne F. (2016). Microalgae culture in building-integrated photobioreactors: Biomass production modelling and energetic analysis. *Chem Eng J*. 284:850–861.
139. Qi H., Wang J. y Wang Z. (2013). A comparative study of maximal quantum yield of photosystem II to determine nitrogen and phosphorus limitation on two marine algae. *J. Sea Res*. 80: 1–11.
140. Radmer R. J. y Kok B. (1976). Photoreduction of O<sub>2</sub> primes and replaces CO<sub>2</sub> assimilation. *Plant Physiol*. 58: 336–340.
141. Rhee G.-Y. (1973). A continuous culture study of phosphate uptake, growth and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol*. 9: 495-506.
142. Richmond A. (2004). *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, UK.
143. Rizhsky L., Liang H. y Mittler R. (2003). The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *J. Biol. Chem*. 278: 38921–38925.
144. Roberts R. L., Green J., Lewis B. (2009). Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clin. Dermatol*. 27(2): 195–201.

145. Rodríguez-Amaya D. B. (2001). A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. International Life Science Institute Press. Washington, D. C. Estados Unidos de America.
146. Ruban A. V. y Johnson M. P. (2010). Xanthophylls as modulators of membrane protein function. Arch. Biochem. Biophys. 504: 78–85.
147. Ruiz-Corral J. A. (2012). Adaptar la agricultura al cambio climático. Ciencia. Oct-Dic. Pag 76-83.
148. Salomon E., Bar-Eyal L., Sharon S. y Keren N. (2013). Balancing photosynthetic electron flow is critical for cyanobacterial acclimation to nitrogen limitation. Biochim. Biophys. Acta. 1827:340–347.
149. Sánchez J. F., Fernández J. M., Ación F. G., Rueda A., Pérez-Parra J. y Molina E. (2008a). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. Process Biochem. 43: 398–405.
150. Sánchez J. F., Fernández-Sevilla J. M., Ación F. G., Cerón M. C., Pérez-Parra J. y Molina-Grima E. (2008b). Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 719–729.
151. Sayre R. (2010). Microalgae: the potential for carbon capture. Bioscience. 60: 722 – 727.
152. Schansker G., Tóth S. Z., Holzwarth A. R. y Garab G. (2013). Chlorophyll a fluorescence: beyond the limits of the QA model. Photosynth Res. DOI 10.1007/s11120-013-9806-5
153. Scholes G. D., Fleming G. R., Olaya-Castro A. y van Grondelle R. (2011). Lessons from nature about solar light harvesting. Nature Chemistry. 3: 763–774.
154. Shen Y., Yuan W., Pei Z. y Mao E. (2010). Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. Appl. Biochem. Biotechnol. 160: 1674–1684.
155. Shi X. M., Jiang Y. y Cheng F. (2002). High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. Biotechnol. Prog. 18: 723-727.
156. Shi X. M., Wu Z. W. y Chen F. (2006) Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures. Mol. Nutr. Food Res. 50: 763–768.

157. Snellen E. L. M., Verbeek A. L. M., van den Hoogen G. W. P., Cruysberg J. R. M. y Hoyng C.B. (2002). Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake. *Acta. Ophthalmol. Stand.* 80: 368-371.
158. Spalding M. H. (2008). Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters. *J. Exp. Bot.* 59: 1463 – 1473.
159. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. y Isambert A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87-96.
160. Stephenson A. L., Dennis J. S., Howe C. J., Scott S. A. y Smith A. G. (2010) Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels* 1:47–58.
161. Stirbet A. y Govindjee (2012). Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth. Res.* 113: 15–61.
162. Stoń-Egiert J. y Kosakowska A. (2005) RP-HPLC determination of phytoplankton pigments—comparison of calibration results for two columns. *Marine Biol.* 147: 251–260.
163. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M. y Srivastava A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. En: Papageorgiou G. C. and Govindjee (Eds): *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer. The Netherlands, pp. 321-362.
164. Torzillo G., Pushparaj B., Masojidek J. y Vonshak A. (2003). Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnol. Bioproc. E.* 8: 338-348.
165. Tredici M. (2004). Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal culture*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 178–214.
166. Ugwu C.U., Aoyagi H. y Uchiyama H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* 99: 4021–4028.
167. Vanormelingen P., Hegewald E., Braband A., Kitschke M., Friedl T., Sabbe K. y Vyverman W. (2007). The systematics of a small spineless *Desmodesmus* species, *D. costato-granulatus* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyceae*), based on ITS2 rDNA sequence analysis and cell wall morphology. *J. Phycol.* 43: 378–396.
168. Varfolomeev S. D. and Wasserman L. A. (2011). Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Appl. Biochem. Microbiol.* 47(9): 789–807.
169. Vega-Estrada J., Montes-Horcasitas M. C., Dominguez-Bocanegra A. R., Cañizares-Villanueva R. O. (2005). *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobiorreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 31-35.

170. Vonshak A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: Richmond A. (Ed) Handbook of microalgal mass culture. Boca Raton, CRC Press, pp 117–145.
171. Vonshak A. (1992). Microalgal biotechnology: is it an economic success?, En: DaSilva E. J., Ratledge C. y Sasson A. (Eds.). Biotechnology: economic and social aspects. Unesco / Cambridge University Press. Cambridge, pp 70-71.
172. Wang B., Lan C. Q. y Horsman M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.* 30: 904–912.
173. Wassink E.C., Kok B y van Oorschot J. L. P. (1953). The efficiency of light energy conversion in *Chlorella* cultures compared to higher plants. En: Burlew J. S. (Eds), Algal culture from laboratory to pilot plant, vol 600. Carnegie Institution of Washington Publication, Washington, pp 55–62.
174. Whitehead A. J., Mares J. A. y Danis R. P. (2006). Macular pigment: a review of current knowledge. *Arch. Ophthalmol.* 124:1038–1045.
175. WHO. World Health Organization (2004). Magnitude and causes of visual impairment. Fact Sheet N° 282. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en>.
176. Wu Y.-H., Yu Y. y Hu H.-Y. (2013). Potential biomass yield per phosphorus and lipid accumulation property of seven microalgal species. *Bioresour. Technol.* 130: 599–602.
177. Wu Y.-H., Yu Y., Li X., Hu H.-Y. y Su Z.-F. (2012). Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresour. Technol.* 112: 193–198.
178. Wu Z. Y. y Shi X. M. (2007). Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 13–18.
179. Wu Z. Y., Shi C. L. y Shi M. X., (2007). Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1233–1238.
180. Xie Y., Ho S-H., Chen C. N., Chen C-Y., Ng I-S., Jing K-J., Chang J-S. y Lu Y. (2013). Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation, *Bioresour. Technol.* 144:435-444.
181. Yamamoto H., Miyake C., Dietz K.-J., Tomizawa K. I., Murata N. y Yokota A. (1999). Thioredoxin peroxidase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett.* 447: 269–273.

182. Zhang D., Wan M., Del Rio-Chanona E.A., Huang J., Wang W., Li Y. y Vassiliadis V.S. (2016) Dynamic modelling of *Haematococcus pluvialis* photoinduction for astaxanthin production in both attached and suspended photobioreactors. *Algal Res.* 13: 69–78.
183. Zijffers J. F., Janssen M., Tramper J. y Wijffels R. H. (2008). Design process of an area-efficient photobioreactor. *Mar. Biotechnol.* 10: 404–415.

**10. ANEXO 1. Análisis de varianza de las productividades de luteína en escala laboratorio y escala piloto en condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie.**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Productividad volumétrica productividad de luteína con estándar

**Normality Test:** Passed (P = 0.758)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
LA pulsos	2	0	0.927	0.107	0.0755
LAG	2	0	0.653	0.000801	0.000567
LAGE	2	0	0.373	0.0244	0.0173

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0.307	0.154	38.437	0.007
Residual	3	0.0120	0.00399		
Total	5	0.319			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.007).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.986

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):  
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
LA pulsos vs. LAGE	0.554	8.768	0.003	0.017	Yes
LAG vs. LAGE	0.280	4.431	0.021	0.025	Yes
LA pulsos vs. LAG	0.274	4.337	0.023	0.050	Yes

## 11. ANEXO 2. Perfil de xantofilas de *Scenedesmus incrassatulus*

A partir de los espectros de absorción de los pigmentos detectados se ha podido realizar la identificación de los mismos comparando las máximas longitudes de onda de absorción detectadas con las reportadas en la literatura para los diferentes pigmentos (Tabla 27). Los pigmentos con (\*) son los que no pudieron ser identificados plenamente debido a que sus absorbancias máximas diferían en 1 o 2 unidades de las absorbancias máximas reportadas para ese pigmento, por lo que la identificación es aproximada, y existe la posibilidad de que estos sean isómeros del pigmento asignado.

**Tabla 27.** Absorbancias máximas características de carotenoides.

Carotenoide	Absorbancias máximas (nm) reportadas	Ref.
9'-Z-neoxantina	414, 438, 466; 327, 416, 439, 468	Nakayama <i>et al.</i> , 2006; de Faria <i>et al.</i> , 2009
9-cis-violaxantina	328, 414, 438, 466	Cortés <i>et al.</i> , 2004
Violaxantina	418, 442, 470	Nakayama <i>et al.</i> , 2006
Anteraxantina o	423, 448, 475 o	Stoń-Egiert y Kosakowska, 2005
cis luteína*	9-cis luteína 421, 443, 471 9'-cis-luteína 423, 449, 463	Delgado-Vargas y Paredes-Lopez, 1996
All trans luteína	448, 476; 447, 476	Nakayama <i>et al.</i> , 2006; Mendes-Pinto <i>et al.</i> , 2004
Epóxido de luteína	444, 468	Ping y Gwendoline, 2006
All-trans- $\alpha$ -caroteno	446, 475; 445, 473	Stoń-Egiert y Kosakowska, 2005; de Faria <i>et al.</i> , 2009
All-trans- $\beta$ -Caroteno	451, 478	de Faria <i>et al.</i> , 2009

De esta forma, en cultivo por Lote baja (Fig. 34) se identificaron los pigmentos 9-cis-violaxantina\*, violaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno\* con tiempos de retención 4.704, 5.016, 7.626 y 9.234 min, respectivamente. En cultivo por Lote media (Fig. 35) se identificaron los pigmentos 9'-Z-neoxantina, 9-cis-violaxantina, violaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno con tiempos de retención 4.126, 4.684, 5.019, 7.633 y 9.260 min, respectivamente. En el tratamiento Lote alta (Fig. 36) se detecto un pigmento que no pudo ser identificado con un tiempo de retención 4.255 min y se identificaron

los pigmentos 9'-Z-neoxantina, 9-cis-violaxantina, violaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno con tiempos de retención 4.597, 4.810, 5.125, 7.682 y 9.449 min, respectivamente.

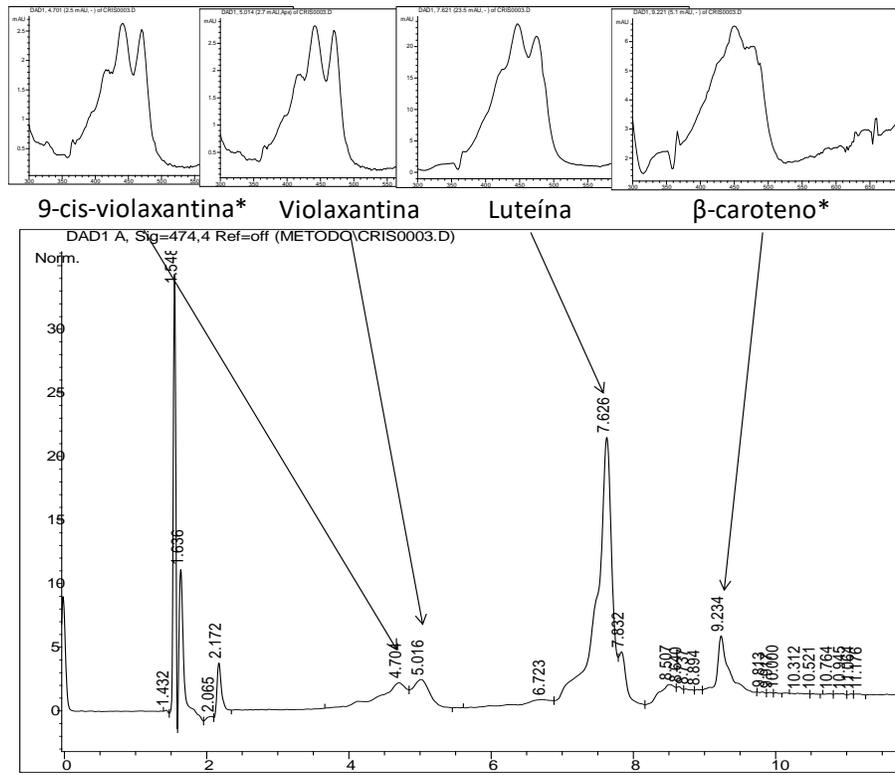


Figura 34. Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatus* en cultivo por lote, Lote baja.

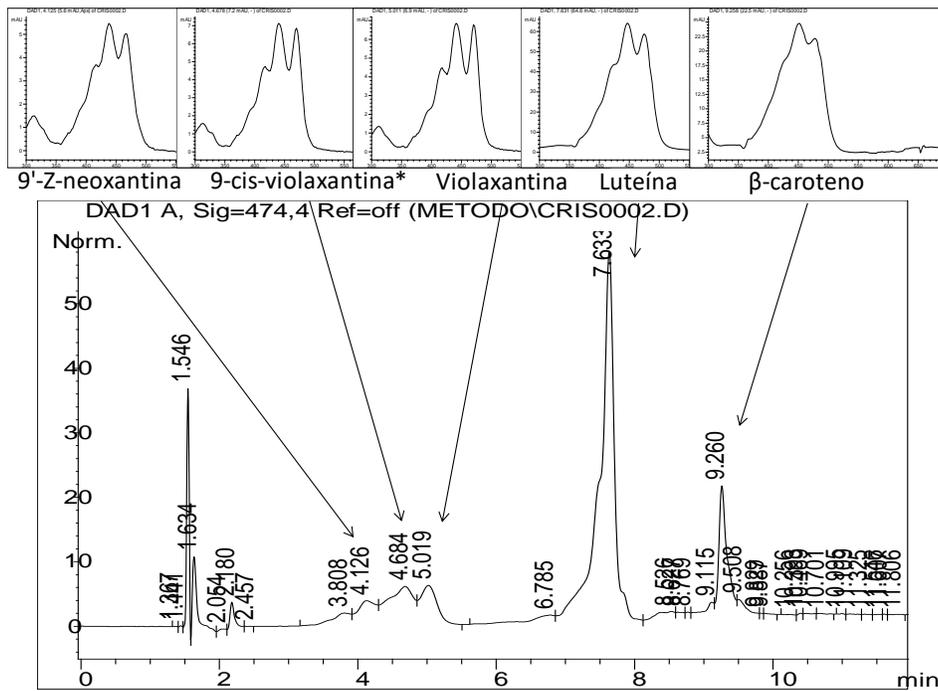
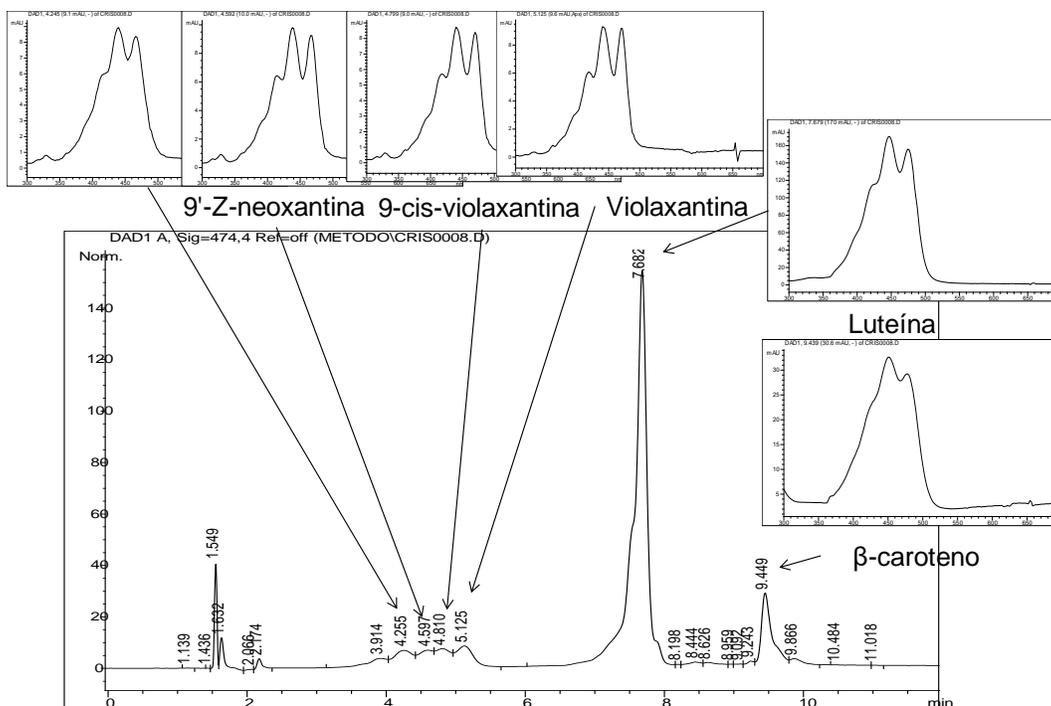


Figura 35. Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatus* en cultivo por lote, Lote media.



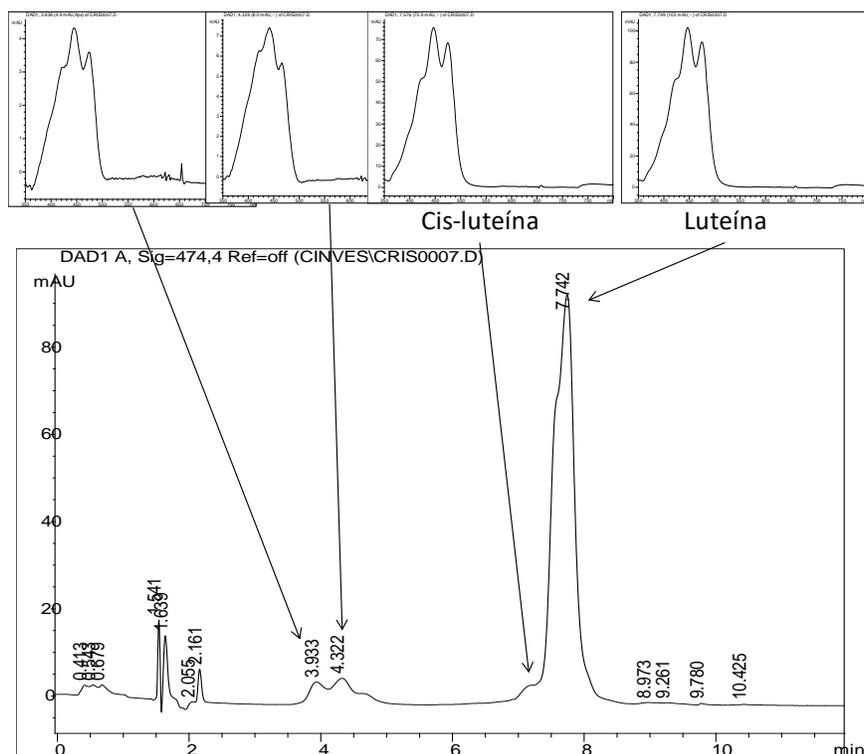
**Figura 36.** Perfil de xantofilas totales de *S. incressatulus* en cultivo por lote, Lote alta.

En lote alimentado (Fig. 37-41) en la mayoría de los tratamientos se pudieron identificar los pigmentos 9'-Z-neoxantina, 9-cis-violaxantina, violaxantina, luteína y β-caroteno. Aunque en el tratamiento LA baja únicamente se pudieron identificar los pigmentos luteína y cis-luteína. En algunos tratamientos en lote alimentado se ha podido observar que all-trans luteína puede eluir acompañada de zeaxantina y en ciertas ocasiones de cis-luteína. Es importante mencionar que se considera que la cis-luteína detectada en algunos tratamientos se genera de la degradación no enzimática de all-trans luteína debido a la inestabilidad inherente de la forma all-trans la cual al degradarse puede formar la forma cis-luteína; la estabilidad de las formas isoméricas en orden de más inestable a menos inestable es el siguiente: all-trans > 9-cis > 13-cis > 15-cis (Guo et al., 2008; Khoo et al., 2011). Por lo tanto, la presencia de cis-luteína puede atribuirse a la degradación de all-trans luteína.

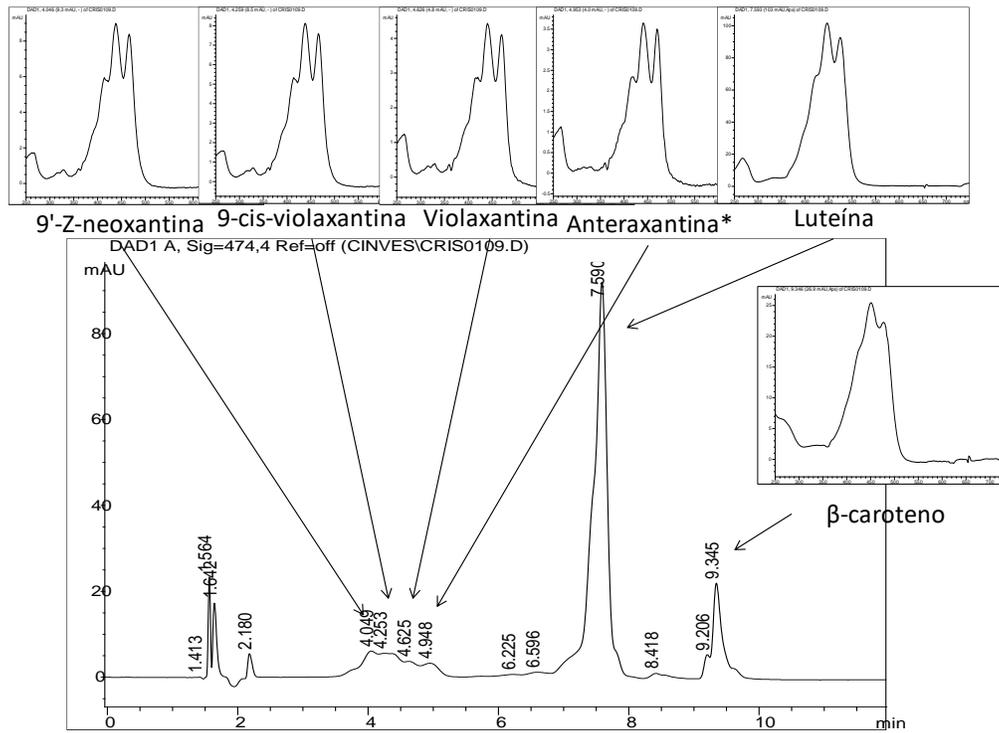
El perfil de xantofilas del tratamiento en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio (LAG), se muestra en la figura 42. Este perfil fue similar al obtenido en los tratamientos en menor escala LA alta y LA pulsos. El perfil de xantofilas del cultivo en escala piloto a la intemperie (Fig. 43) fue también similar al de otros cultivos en lote alimentado realizados en condiciones controladas de

laboratorio. Esto nos indica que el perfil de xantofilas de *S. incrassatulus* detectado en escala laboratorio se conservo en la escala piloto e inclusive cuando el cultivo fue implementado a la intemperie.

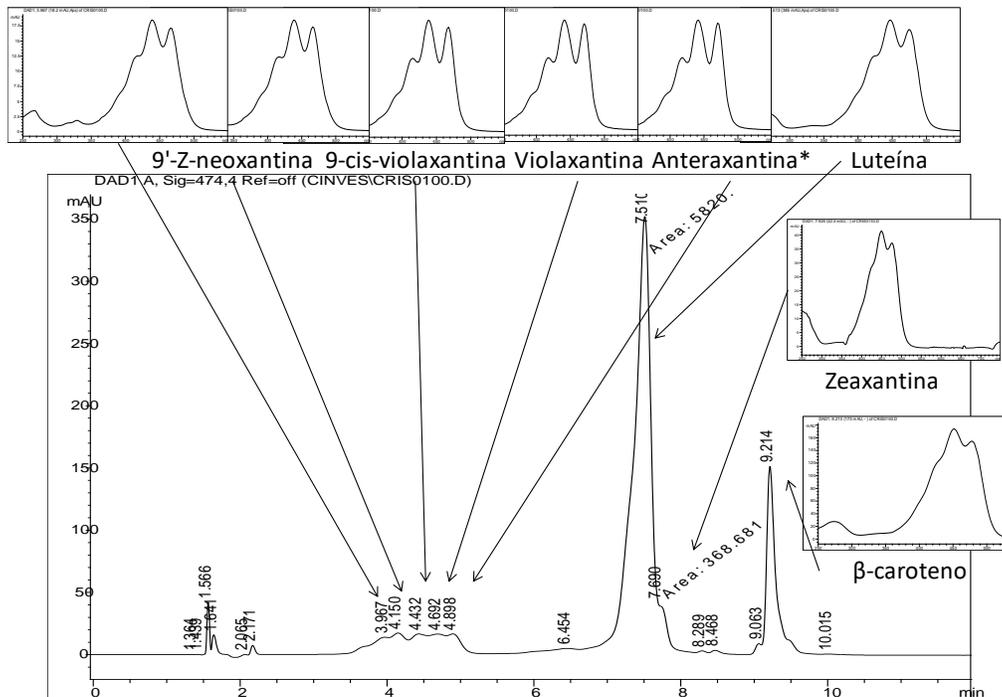
En todos los tratamientos pudo identificarse a all-trans luteína como el pigmento mayoritario. Los otros pigmentos detectados en orden descendente de cantidad detectada fueron  $\beta$ -caroteno, violaxantina y 9'-Z-neoxantina, los cuales forman parte de los pigmentos que se requieren para el correcto funcionamiento de los fotosistemas. Algunos reportes establecen que la variedad de xantofilas en los complejos captadores de luz del fotosistema II (LHCII, por sus siglas en inglés) es necesaria para obtener el nivel de eficiencia óptima de la fotosíntesis, así como el control de la misma, en cuanto a disipación de energía. La variedad de tipos de xantofilas puede reflejar el papel que desempeñan las xantofilas cuando se forma la estructura del LCHII y, por lo tanto, la eficiencia de los procesos de captación de luz en ambientes específicos de luz (Ruban y Johnson, 2010) y nutrientes. Por lo tanto, se puede decir que los perfiles detectados, sobre todo en lote alimentado, son los que promueven las más altas eficiencias de captación y aprovechamiento de luz, así como la estabilidad de los fotosistemas.



**Figura 37.** Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatulus* en cultivo por lote alimentado, LA baja.



**Figura 38.** Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatulus* en cultivo por lote alimentado, LA media.



**Figura 39.** Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatulus* en cultivo por lote alimentado, LA alta.

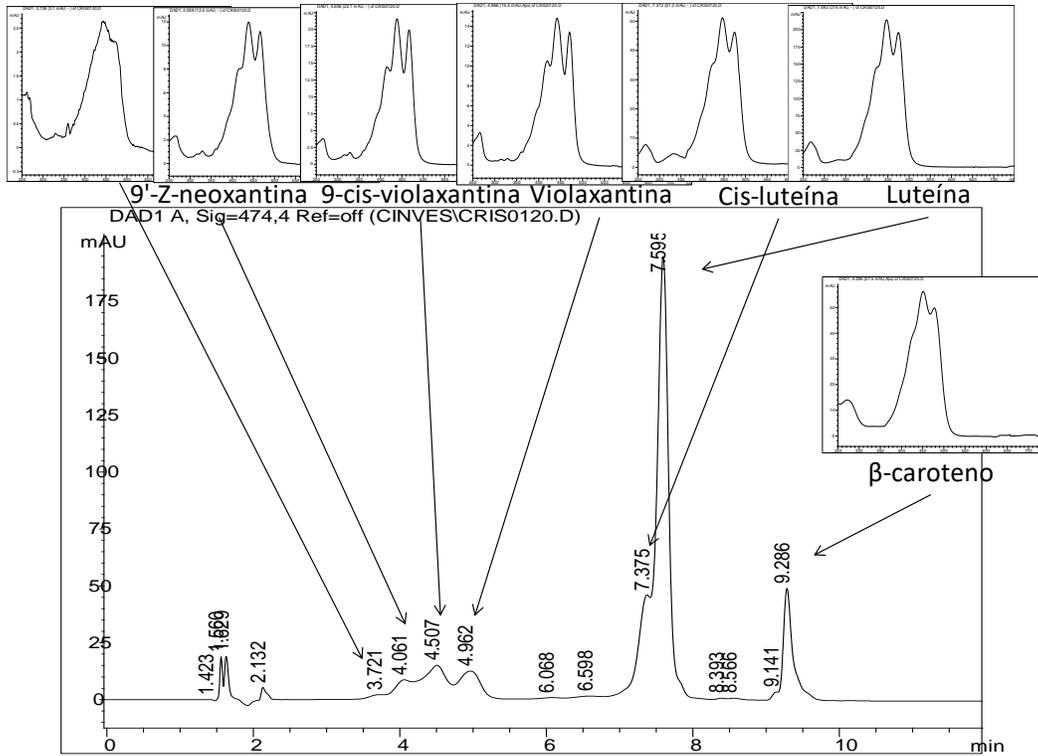


Figura 40. Perfil de xantofilas totales *S. incrassatus* en cultivo por lote alimentado, LA baja de igual masa total de N a LA alta.

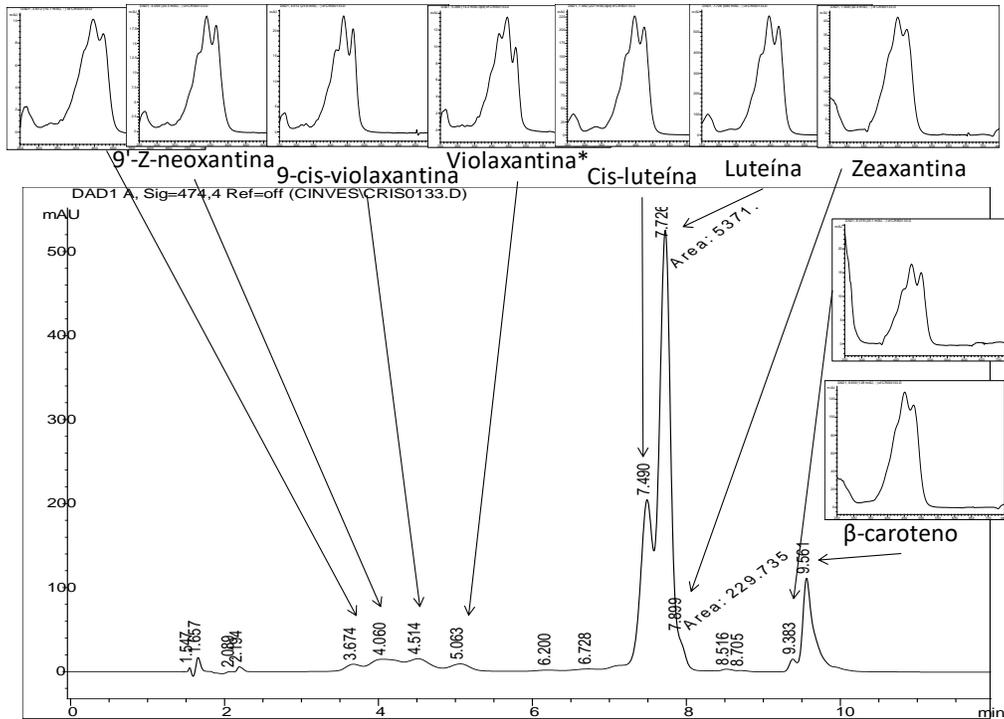
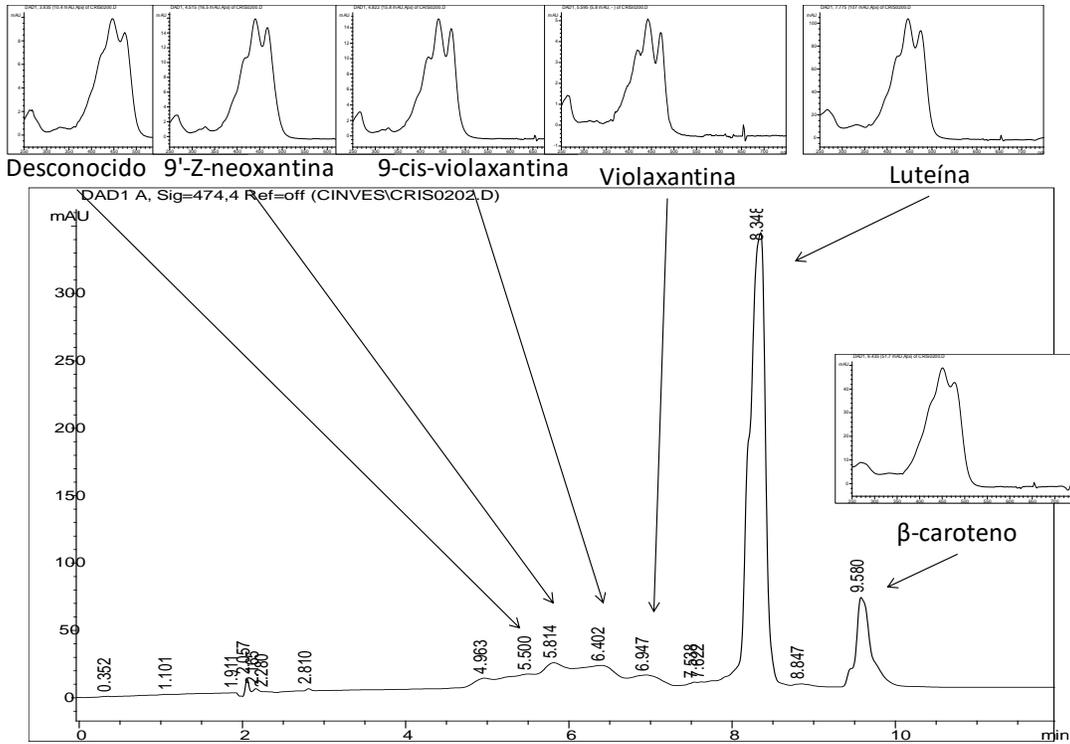
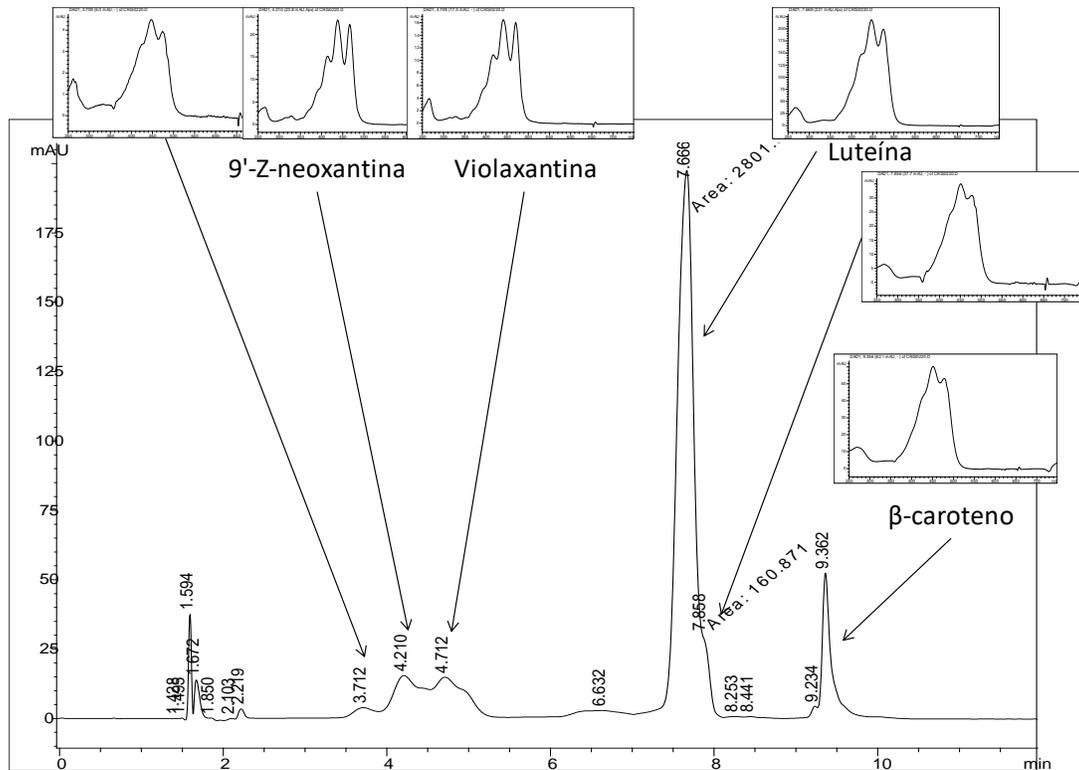


Figura 41. Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatus* en lote alimentado, LA pulsos.

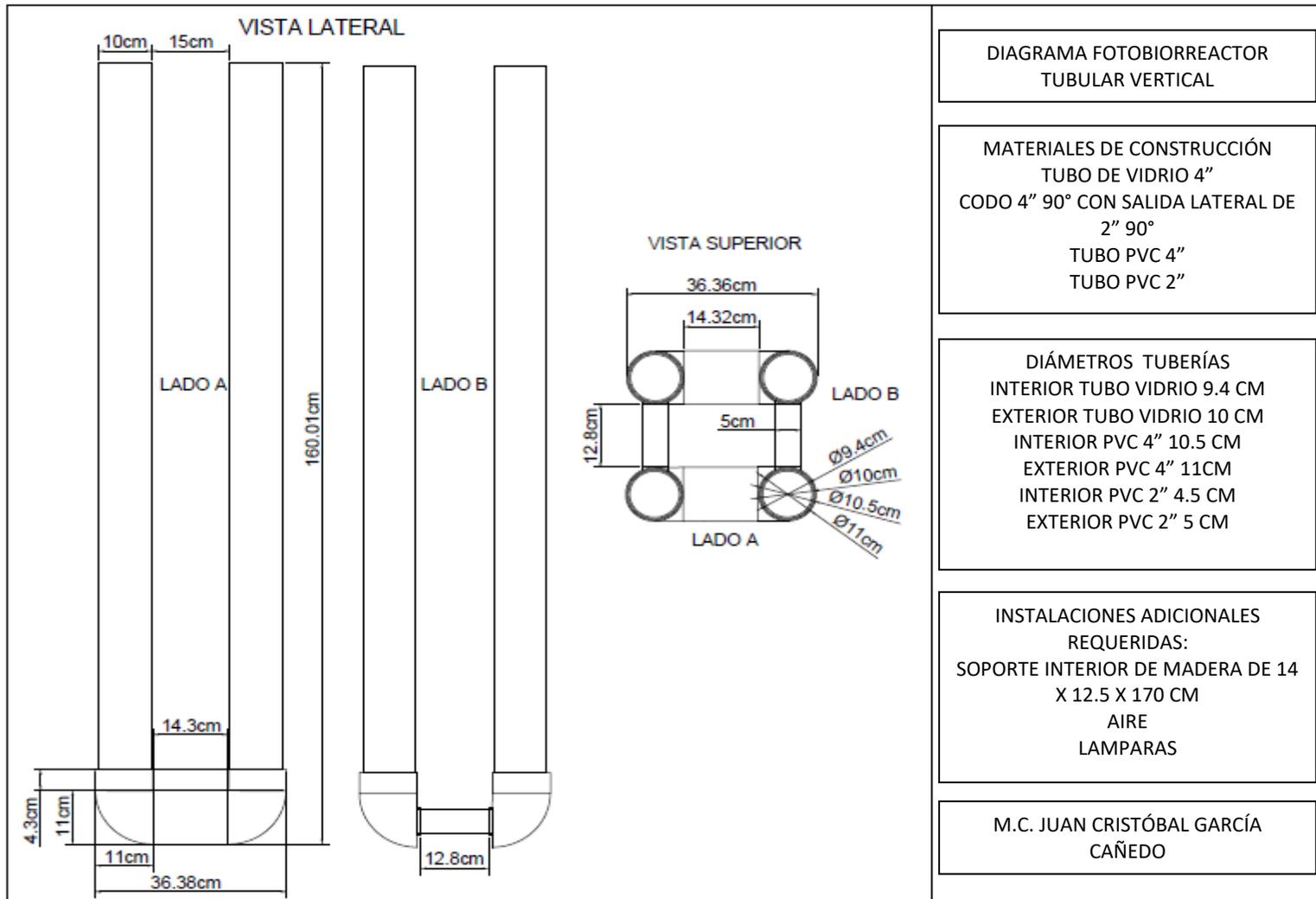


**Figura 42.** Perfil de xantofilas totales de *S. incrassatus* en lote alimentado por pulsos en escala piloto en condiciones controladas de laboratorio.



**Figura 43.** Perfil de xantofilas totales de *Scenedesmus incrassatus* en lote alimentado por pulsos en escala piloto a la intemperie.

## 12. ANEXO 3. Diagrama de fotobiorreactor tubular vertical de 40L.





**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

México, D.F., a 28 de Marzo de 2017

Dra. Josefina Barrera Cortés  
Coordinador Académico  
Depto. de Biotecnología y Bioingeniería  
Presente.

Los suscritos:

Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva, Investigadora Titular del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN, Directora de Tesis.

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, Investigadora Titular del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN, Asesora.

Dr. Fernando José Esparza García, Investigador Titular del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN, Asesor.

Dr. Eliseo Cristiani Urbina, Investigador Titular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Asesor.

Dr. César Mateo Flores Ortiz, Investigador Titular de la Facultad de Estudios Superiores-UNAM-Iztacala, Asesor.

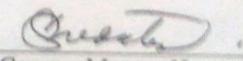
Designados para la revisión del texto y contenido del trabajo de tesis intitulado: **“Escalamiento de un cultivo por lote alimentado de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* para la producción de luteína”.**

Que presenta **Juan Cristóbal García Cañedo**, estudiante de Doctorado del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

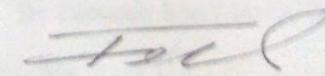
Consideramos que las correcciones y sugerencias han sido hechas, y solicitamos se realicen los trámites correspondientes para la presentación del examen de grado, mismo que se llevará a cabo el próximo 25-Abr-2017, a las 12:00 en el Auditorio Departamental de Biotecnología. Anexamos el escrito definitivo y aceptamos que no habrá ningún cambio.

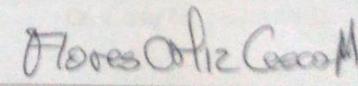
Atentamente  
Comité Tutorial

  
Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

  
Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

  
Dr. Eliseo Cristiani Urbina

  
Dr. Fernando José Esparza García

  
Dr. César M. Flores Ortiz