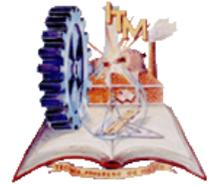




EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MORELIA

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

TESIS DOCTORAL

TÍTULO DEL PROYECTO

Modelo estadístico para la cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactor evaluando las variables eléctricas y bioquímicas óptimas mediante el método de Taguchi

PRESENTADO POR:

MC. JESÚS ALBERTO CORONADO REYES

NÚMERO DE CONTROL: **D10120615**

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Morelia, Michoacán, noviembre del 2023

Morelia, Michoacán, **25/septiembre/2023**
OFICIO No. DEPI/337/2023

ASUNTO: Autorización de impresión definitiva de tesis

JESÚS ALBERTO CORONADO REYES
EGRESADO DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
PRESENTE

Le comunico que el jurado designado para que obtenga el grado de DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, ha informado a esta División de Estudios de Posgrado e Investigación, su aceptación para la impresión definitiva de su trabajo de tesis, el cual lleva por nombre: "MODELO ESTADÍSTICO PARA LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA CHLORELLA VULGARIS EN FOTOBIOREACTOR EVALUANDO LAS VARIABLES ELÉCTRICAS Y BIOQUÍMICAS ÓPTIMAS MEDIANTE EL MÉTODO DE TAGUCHI". Por lo anterior se le autoriza la impresión de su trabajo, esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
"Técnica, Progreso de México"®




HÉCTOR JAVIER VERGARA HERNÁNDEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
HJVHlaa▼





Morelia, Michoacán, **18/septiembre/2023**

OFICIO N° DCI. 066/2023

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Morelia, Michoacán, siendo las **13:00** horas del día 18 de septiembre de 2023, se reunieron los Miembros del Comité Tutorial de Tesis, designados por el Claustro del Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, para examinar la tesis de grado titulada:

"Modelo estadístico para la cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactor evaluando las variables eléctricas y bioquímicas óptimas mediante el método de Taguchi"

Presentada por el(la) alumno(a):

M. C. JESÚS ALBERTO CORONADO REYES, con número de Control D10120615

Aspirante al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron su **APROBACIÓN PARA LA IMPRESIÓN FINAL DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

Presidente y Secretario:


Dr. Juan Carlos González Hernández.
D. en Ciencias
Cédula Profesional 4275628

Secretario:


Dra. Beatriz Juárez Campos
D.C. en Ingeniería Eléctrica
Cédula Profesional 10503219

Vocal:


Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez.
D. en Ciencias de los Alimentos
Cédula Profesional 11144772

Vocal:


Dr. Constantín Alberto Hernández Bocanegra
D.C. en Ingeniería Metalúrgica y Cerámica
Cédula Profesional 11730030

Vocal:


Dr. José Ángel Ramos Banderas.
D. en Metalurgia y Materiales
Cédula Profesional 4574372

Vocal Suplente:


Dr. Francisco Reyes Calderón.
D.C. en Metalurgia y Ciencias de los Materiales
Cédula Profesional 09059862



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	12
II. JUSTIFICACIÓN	14
2.1.1 Económico	15
2.1.2 Ambiental	15
2.1.3 Social	15
III. OBJETIVO	17
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
V. MARCO TEORICO	18
5.1 Las microalgas	18
5.2 Metabolismo	18
5.2.1 Metabolismo primario	18
5.2.2 Metabolismos secundarios	19
5.3 Actividad antioxidante	22
VI. ANTECEDENTES	23
VII. METODOLOGÍA	27
7.1 Desarrollo experimental a nivel matraz	27
7.2 Desarrollo experimental a nivel fotobiorreactor	30
VIII. RESULTADOS	33
8. 1 Diseño, maquinado y construcción de fotobiorreactor	
8.1.1 Diseño mecánico	33
8.1.2 Instrumentación	34
8.1.3 Configuración experimental	36
8.1.4 Aplicación experimental bioquímica	37
8.1.5 Calibración	39
8. 2 Cinéticas microbianas a nivel matraz	
8. 3 Cinéticas microbianas a nivel fotobiorreactor	
IX. CONCLUSIONES	74
X. ASPECTOS RELEVANTES	76
XI. AGRADECIMIENTOS	78
XII. REFERENCIAS	79
XIII. ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de biomasa y clorofilas con respecto de la variación de CO ₂ en el medio de cultivo.....	23
Figura 2. Efecto de la temperatura y CO ₂ en el crecimiento celular y síntesis de pigmentos de <i>C. vulgaris</i>	24
Figura 3. Concentración celular a diferentes fotoperiodos e intensidad de luz, donde para la figura (a) se utilizó una intensidad de 37.5 μmol de fotones/m ² s, (b) de 62.5 μmol de fotones/m ² s y c) de 100 μmol de fotones/m ² s (tomado y modificado de Seyfabadi et al.,2011)	24
Figura 4. Diagrama de flujo operacional para las cinéticas experimentales de <i>C. vulgaris</i> a nivel matraz con acetato de sodio (C ₂ H ₃ NaO ₂) y glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) como sustratos orgánicos. Medio fotoheterotrófico.....	29
Figura 5. Diagrama de flujo operacional para las cinéticas experimentales de <i>C. vulgaris</i> a nivel fotobiorreactor con nitrato de sodio (NaNO ₃) como sustrato orgánico y CO ₂ como sustrato inorgánico. Medio mixotrófico.....	32
Figura 6. Fotobiorreactor de crecimiento de microalgas con monitoreo en tiempo real de: pH, temperatura y oxígeno disuelto (O ₂), control de intensidad lumínica. (A) Difusor. (B) Soporte para sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto. (C) Tapas de sensores (B). (D) sensor de pH. (E) Sensor de oxígeno disuelto. (F) Cubierta de fuente de luz LED azul. (G) Fuente de luz LED azul. (H) Recipiente interno para fuente de luz. (I) Tapones de PLA para toma de muestras e inyección de CO ₂ . (J) Tapón de PLA para futuros accesorios. (K) Recipiente externo para medio de crecimiento de microalgas. (L) Soporte para fotobiorreactor de 4 postes. (M) Cubierta de acero inoxidable.	33
Figura 7. Circuito diseñado para conexión de termopar y tarjeta de adquisición de datos del sistema embebido en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas.....	35
Figura 8. Circuito diseñado para la conexión de la fuente de luz LED y la tarjeta de adquisición de datos del sistema integrado en el fotobiorreactor para controlar la intensidad de la luz medida en Luxes durante el crecimiento de las microalgas.....	36
Figura 9. Diagrama de ensamblaje general de los componentes metálicos, de vidrio y eléctricos del fotobiorreactor para el crecimiento de microalgas con monitoreo en tiempo real para la optimización de los rendimientos de metabolitos primarios y secundarios.....	36
Figura 10. Aspecto final del fotobiorreactor. (A) Gabinete con componentes electrónicos. (B) Fuente de alimentación de 24 voltios. (C) Tarjeta de adquisición de datos. (D) Arreglo electrónico para sensor de temperatura. (E) Arreglo electrónico para sensor de oxígeno disuelto. (F) Arreglo electrónico para sensor de pH. (G) Disposición electrónica para la regulación de la intensidad de la luz. (H) Fotobiorreactor montado con sensores de monitoreo en tiempo real y fuente de luz LED azul.	39
Figura 11. Curva de calibración de sensor de temperatura en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. n=3, α=0,05.	40
Figura 12. Curva de calibración de sensor de oxígeno disuelto (O ₂) en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. n=3, α=0,05.	41
Figura 13. Curva de calibración de sensor de pH en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. n=3, α=0,05.	42
Figura 14. Curva de calibración de intensidad de luz en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. n=3, α=0,05.	43

Figura 15. Crecimiento celular de *C. vulgaris* en medio fotoheterotrófico: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □0,0005 g/L, ●0,001 g/L y ▲0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □0.27 g/L, ●0.33 g/L y ▲0.44 g/L de concentración de glicerol. 46

Figura 16. Biomasa de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □0,0005 g/L, ●0,001 g/L y ▲0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □0.27 g/L, ●0.33 g/L y ▲0.44 g/L de concentración de glicerol. 49

Figura 17. Consumo de sustrato de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □0,0005 g/L, ●0,001 g/L y ▲0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □0.27 g/L, ●0.33 g/L y ▲0.44 g/L de concentración de glicerol. 50

Figura 18. Actividad antioxidante de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico con el método ABTS^{•+}: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □0,0005 g/L, ●0,001 g/L y ▲0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □0.27 g/L, ●0.33 g/L y ▲0.44 g/L de concentración de glicerol. 51

Figura 19. Actividad antioxidante de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico con método DPPH[•]: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □0,0005 g/L, ●0,001 g/L y ▲0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □0.27 g/L, ●0.33 g/L y ▲0.44 g/L de concentración de glicerol. 52

Figura 20. Crecimiento microbiano para *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperíodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperíodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05. 58

Figura 21. Análisis de efectos principales para el crecimiento celular con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO₃ y tipo de fotoperíodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO₃. (B) 1= fotoperíodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperíodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05. 59

Figura 22. Análisis de ANOVA para el crecimiento celular (CC) de *C. vulgaris* con nitrato de sodio NaNO₃ como sustrato e inyecciones de CO₂. Medio mixotrófico. (1) 3.6 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. (2) 16.4 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (3) 3.6 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (4) 16.4 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05. 60

Figura 23. Biomasa generada por *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05. 61

Figura 24. Análisis de efectos principales para la biomasa con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO₃ y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO₃. (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05..... 62

Figura 25. Análisis de ANOVA para la biomasa de *C. vulgaris* con nitrato de sodio NaNO₃ como sustrato e inyecciones de CO₂. Medio mixotrófico. (1) 3.6 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. (2) 16.4 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (3) 3.6 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (4) 16.4 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05..... 63

Figura 26. pH en medio mixotrófico de *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05. 64

Figura 27. Análisis de efectos principales para el comportamiento del pH en el medio de crecimiento con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO₃ y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO₃. (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05. 66

Figura 28. Consumo de sustrato en cinéticas microbianas de *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05. 67

Figura 29. Actividad antioxidante a través del método de ABTS^{•+} para *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05. 668

Figura 30. Análisis de efectos principales para la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO₃ y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO₃. (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05..... 69

Figura 31. Actividad antioxidante a través del método de DPPH' para <i>C. vulgaris</i> en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO ₂ . (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05.	70
Figura 32. Análisis de efectos principales para la actividad antioxidante por el método de DPPH' con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO ₃ y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO ₃ . (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05..	71
Figura 33. Portada de artículo de revisión con JCR acerca de la microalga <i>C. vulgaris</i>	84
Figura 34. Portada de artículo con JCR acerca del crecimiento de la microalga <i>C. vulgaris</i> bajo condiciones fotoheterotróficas a nivel matraz.....	83
Figura 35. Título de propiedad industrial para PATENTE de diseño de fotobiorreactor para crecimiento de microalgas.....	86
Figura 36. Citio Web donde se muestra participación como colaboración del capítulo 10 acerca de proteínas de microalgas.....	87
Figura 37. Oficio para acto recepcional de titulación en la modalidad de “Tesis” donde se participó como co-asesor.....	88
Figura 38. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 1.....	89
Figura 39. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 2.....	90
Figura 40. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 3.....	91
Figura 41. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 4.....	92
Figura 42. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 5.....	93
Figura 43. Constancia de participación en congreso ICTI en el año 2020.....	94
Figura 44. Constancia de participación en congreso ICTI en el año 2021.....	95
Figura 45. Constancia de participación en congreso ICTI en el año 2022.....	96
Figura 46. Constancia de participación en congreso AMIDIQ en el año 2022.....	97
Figura 47. Carta de aceptación para participación en congreso de ciencias básicas dentro del Instituto Tecnológico de Morelia. Año 2022.....	98
Figura 48. Portada de propuesta de artículo con registro JCR sobre diseño de fotobiorreactor para crecimiento de microalgas.....	99

RESUMEN

Chlorella vulgaris es una microalga de la familia *Chlorellaceae* que se caracteriza por crecer en una amplia gama de medios de cultivo y, por tanto, su composición química varía dependiendo de estos y otros factores como el pH, la temperatura de crecimiento, agitación, tiempo de exposición a la luz, intensidad de la luz, e incluso el tipo de sustrato, ya sea inorgánico (nitratos, fosfatos, sulfatos, azúcares, lípidos o alguna fuente de nitrógeno) o inorgánico (CO₂). Dependiendo de estos factores, las microalgas producen metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios, como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, son esenciales para su crecimiento. Los metabolitos secundarios por otro lado, son aquellos que se producen en determinadas etapas del crecimiento de los organismos y funcionan como defensa cuando la célula se ve sometida a condiciones de estrés o condiciones no favorables en el medio de crecimiento. Dentro de estos metabolitos se encuentran los terpenoides, polifenoles y alcaloides. Es por ello que el objetivo de este trabajo es evaluar la presencia de metabolitos secundarios con actividad antioxidante por el método radical de DPPH[•] y ABTS^{•+} en cinéticas de *C. vulgaris* bajo diferentes sistemas de crecimiento, nivel de matraz y nivel de fotobiorreactor, variando el tipo de sustrato, su concentración y tiempo de exposición a la luz (fotoperiodo).

A nivel de matraz se utilizó como sustratos acetato de sodio y glicerol, variando en 0.0005 g/L, 0.001 g/L y 0.0015 g/L para el acetato de sodio y concentraciones de 0.27 g/L, 0.33 g/L y 0.44 g./L para glicerol. Para ambos casos, la variación del fotoperiodo consistió en un nivel bajo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El diseño de experimentos a nivel de matraz fue una matriz de datos para un diseño de cribado 2² con puntos 2 centrales. El medio de crecimiento fue fotoheterótrofo, con una única fuente de carbono como sustrato, acetato de sodio y glicerol. Como análisis *Post hoc* se realizaron análisis ANOVA unidireccional y análisis *HSD Tukey-Kramer* con un valor de significancia de 0.05.

En cuanto a la cinética a nivel de fotobiorreactor, se trabajó bajo un diseño Taguchi L4(2²) donde se utilizó como sustrato nitrato de sodio (NaNO₃) a una concentración de 3.6 mM y 16.4 mM, con los mismos niveles de fotoperiodos (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, y a la inversa), pero en este caso se realizaron inyecciones de CO₂ como fuente adicional de carbono inorgánico para que el crecimiento fuera mixotrófico. Como análisis *Post hoc* se realizó análisis ANOVA de una vía, diagramas de efectos principales sobre las medias obtenidas y finalmente *correlaciones de Pearson* con un valor de significancia de 0.05.

Para ambos crecimientos, fotoheterotrófico (matraz) y mixotrófico (fotobiorreactor), se tomaron como variables de respuesta: crecimiento celular (CC), biomasa, consumo de sustrato, pH y formación de metabolitos con actividad antioxidante mediante el método ABTS^{•+}; así como mediante el método DPPH[•].

Finalmente, es importante mencionar que, como parte de este trabajo de investigación, y para realizar la cinética a nivel de fotobiorreactor, se diseñó, maquinó e instrumentó el fotobiorreactor utilizado en la experimentación.

ABSTRACT

Chlorella vulgaris is a microalgae of the *Chlorellaceae* family that is characterized by growing in a wide range of culture media and, therefore, its chemical composition varies depending on these and other factors such as pH, growth temperature, agitation, light exposure time, light intensity to carry out photosynthesis, and even the type of substrate, whether inorganic (nitrates, phosphates, sulfates, sugars, lipids, or some nitrogen source) or inorganic (CO₂). Depending on these factors, the microalgae will produce primary and secondary metabolites. The primary metabolites, such as proteins, carbohydrates, lipids, and nucleic acids, are essential for its growth. Secondary metabolites are those produced at certain stages of the growth of organisms and function as a defense when the cell is subjected to stress conditions or no favorable conditions in the growth medium. Within these metabolites are terpenoids, polyphenols, and alkaloids. That is why the objective of this work is to evaluate the presence of secondary metabolites with antioxidant activity by the radical method of DPPH[•] and ABTS^{•+} in samples obtained from *C. vulgaris* kinetics under different growth systems such as a flask level and photobioreactor level, varying in the same way the type of substrate, as well as its concentration and finally evaluating the effect of exposure time to light (photoperiod).

At the flask level, sodium acetate and glycerol were used as substrates, varying in 0.0005 g/L, 0.001 g/L, and 0.0015 g/L for sodium acetate and concentrations of 0.27 g/L, 0.33 g/L, and 0.44 g/L for glycerol. For both cases, the photoperiod variation consisted of a low level of 8 hours of light and 16 hours of darkness and 16 hours of light and 8 hours of darkness. The design of experiments at the flask level was a data matrix for a 2² screening design with center points. The growth medium was photoheterotrophic, with a single source of carbon as a substrate, which were sodium acetate and glycerol. In this experimentation, there is an absent of CO₂ as a source of inorganic carbon. As *Post hoc* analysis, one-way ANOVA analysis and *HSD Tukey-Kramer* analysis with a significance value of 0.005 were carried out.

Regarding the kinetics at the photobioreactor level, we worked under a Taguchi L4(2²) design where sodium nitrate (NaNO₃) was used as a substrate at a concentration of 3.6 mM and 16.4 mM, with the same levels of photoperiods (8 hours of light and 16 hours of darkness, and inversely), but in this case, CO₂ injections were performed as an additional source of inorganic carbon so that the growth was mixotrophic. As a *Post hoc* analysis, one-way ANOVA analysis, main effects diagrams on the means obtained and finally *Pearson correlations* with a significance value of 0.005 were carried out.

For both growths, photoheterotrophic (flask) and mixotrophic (photobioreactor), the following were taken as response variables: cell growth (CC), biomass, substrate consumption, pH, and formation of metabolites with antioxidant activity through the ABTS^{•+} method, as well as through the DPPH[•] method.

Finally, it is essential to mention that, as part of this work, and to perform the kinetics at the photobioreactor level, the photobioreactor used in the experimentation was designed, machined, and instrumented.

ABREVIATURAS, UNIDADES Y FÓRMULAS QUÍMICAS UTILIZADAS

AA	Ácido araquidónico.
ABTS^{•+}	Radical del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico.
AI	Entrada analógica.
AO	Salida analógica.
C	Carbono o carbonos.
CC	Crecimiento celular.
CNS	Carbon neutralization system.
CO₂	Dióxido de carbono.
DHA	Ácido docosahexanoico.
DPPH[•]	Radial del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
G	Gramo.
EPA	Ácido icosapentanoico.
EROs	Especies reactivas de oxígeno.
H	Horas.
HCl	Ácido clorhídrico.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
LED	Diodo emisor de luz.
Mg	Miligramo.
mM	Milimolar.

Nm	Nanómetros.
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADHP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Enzima.
NaNO₃	Nitrato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
M	Molar.
O₂	Oxígeno.
O₂⁻	Anión súper oxido.
OH⁻	Radical hidroxilo.
OLED	Diodo emisor de luz orgánico.
Psi	Libra de fuerza por pulgada cuadrada. Presión.
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados.
SMD	Tecnología de dispositivos de superficie.
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
µmol	Micromoles.
t_d	Tiempo de duplicación.
UV	Ultravioleta.
rpm	Revoluciones por minuto.
Wifi	Conexión inalámbrica.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de las microalgas ha cobrado importancia en los últimos años, debido a que las microalgas son consideradas como materia prima de compuestos químicos que resultan de su tratamiento primario y secundario (Chun yen *et al.*, 2011). Ejemplos de metabolitos primarios incluyen: lípidos para generar biodiesel (Barbosa *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2019); proteínas para la formulación de suplementos alimenticios o alimentos funcionales (Ursu *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2019); y carbohidratos que se utilizan como fuente de fibra para los alimentos (Angelo & Neuza, 2007; Ardila-Álvarez *et al.*, 2017). Por otro lado, existen metabolitos secundarios, entre los que, en *C. vulgaris*, se encuentran pigmentos como la clorofila (Seyfabadi & Amanpour, 2011), que constituye del 1 al 2% del peso seco de la biomasa. Además de estos pigmentos, también existe la presencia de carotenoides, que pertenecen al grupo de metabolitos secundarios llamados terpenos. Los carotenoides identificados en las microalgas son esencialmente β -carotenos que se asocian con lípidos presentes en los cloroplastos, así como con clorofilas y tilacoides en los propios cloroplastos. Los pigmentos identificados han sido evaluados por su actividad antioxidante (Durán & Padilla, 1993) y se ha informado que se han extraído utilizando solventes como dimetilformamida, diclorometano, acetona, hexano y etanol, mediante métodos como Soxhlet, extracción asistida por ultrasonidos y fluidos supercríticos. Entre los principales pigmentos que se han identificado en *C. vulgaris* se encuentran los β -carotenos, la astaxantina, la cantaxantina, la luteína, la clorofila a y b, la feofitina a y b y la violoxantina. Como se puede observar, *C. vulgaris* contiene polifenoles como la luteolina, por lo que sería posible utilizar otros disolventes, con los que se pueda evaluar y caracterizar, en caso de haber otros (Coronado-Reyes *et al.*, 2022). Respecto a los polifenoles en *C. vulgaris* (Gómez *et al.*, 2016), recientemente se ha reportado que existe presencia, y que es posible tener una concentración de 217 mg/100 g de muestra seca en extractos acuosos, y una concentración de 109 mg/100 g de muestra seca en extractos acuosos 100 g de muestra seca en extractos etanólicos. Lo anterior se estableció al realizar la maceración de biomasa liofilizada con solventes polares como agua y etanol 96% p/p. Los polifenoles se cuantificaron mediante el método de *Folin-Ciocalteu*, utilizando ácido gálico como control positivo y expresando los resultados en equivalentes de ácido gálico. Además de esto, se evaluó la actividad antioxidante del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) método. Para ABTS⁺ hubo una inhibición solo en los extractos acuosos de 83-93%, y para DPPH[•] hubo una inhibición en los mismos extractos de 80.1%, por lo que fue interesante ampliar nuestro conocimiento sobre la extracción de estos metabolitos. y cómo incrementar los rendimientos que existen actualmente, ya que generalmente se utilizan en la industria alimentaria o en medicina, y se extraen de otros materiales como frutos, tallos, hojas y flores (Gómez *et al.*, 2016).

La principal razón para utilizar microalgas a nivel industrial es porque su cultivo es fácil y rápido, ya que completan su ciclo de crecimiento en pocos días, pudiendo crecer en agua salada, agua dulce, aguas residuales y en ocasiones en tanques de fermentación (Blair *et al.*, 2014). *C. vulgaris* es un tipo de microalga que puede crecer fácil y rápidamente. De todas las especies conocidas de microalgas, *C. vulgaris* es una de las que se adapta más fácilmente y su metabolismo puede ser fotoautótrofo, fotoheterotrófico o mixotrófico en sistemas de cultivo abiertos o cerrados (De Morais *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2008; Acién *et al.*, 2012). Se ha observado que la mayor concentración de biomasa de *C. vulgaris* se genera cuando se

trabaja en condiciones mixotróficas a nivel de matraz y fotobiorreactor (Chiu *et al.*, 2008; Chun-Yen *et al.*, 2011). Por tanto, es interesante investigar el crecimiento de *C. vulgaris* en condiciones fotoheterotróficas a nivel de matraz, así como a nivel fotobiorreactor para identificar los factores que tienen un efecto significativo en el crecimiento de *C. vulgaris* proponiendo puntos óptimos operacionales. Dentro de las condiciones de crecimiento que se han investigado respecto al tipo de sustrato, destaca el titulado 'Efecto del glicerol y la glucosa en la mejora de la producción de biomasa, lípidos y carbohidratos solubles por *C. vulgaris* en cultivo mixotrófico, donde se observa que *C. vulgaris* puede crecer con glicerol como sustrato, pero en menor medida cuando se utiliza una mezcla de glicerol y glucosa. Sin embargo, es importante encontrar condiciones en las que se pueda reemplazar la glucosa, ya que este sustrato hace que el proceso sea costoso. Para este estudio, el crecimiento se realizó bajo concentraciones de 1, 5 y 10 g/L de glicerol, al que se le adicionaron 2 g/L de glucosa, bajo un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, en un volumen de 100 ml de medio durante 96 h (4 días) (Kong *et al.*, 2013). Se variaron las concentraciones de sustrato e incluso el tipo de fotoperiodo, para aumentar el crecimiento y la síntesis de metabolitos. En cuanto al fotoperíodo para el cultivo fotoheterótrofo de microalgas, la fuente de luz puede ser proporcionada por el sol o una fuente de luz artificial, pero sólo ciertas longitudes de onda de luz, que van desde 400 a 700 nm, son efectivas para la fotosíntesis productiva de las algas. Además, diferentes especies responden de manera diferente a las longitudes de onda de la luz, debido a variaciones en sus pigmentos. Sin embargo, se ha observado que la luz roja, con un espectro estrecho de 600 a 700 nm, es la longitud de onda óptima para el crecimiento de la mayoría de las especies de algas. Esto se debe principalmente a que los pigmentos más abundantes en la mayoría de las especies son las clorofilas, que pueden absorber la luz roja de manera más eficiente en comparación con otras longitudes de onda de luz. La luz con una longitud de onda más corta (por ejemplo, la luz azul) tiene una mayor probabilidad de causar fotoinhibición al golpear el complejo de células recolectoras de luz en su pico de energía eléctrica, debido a su alta energía. Sin embargo, debido a su longitud de onda más larga, la menor energía luminosa de la luz roja inhibe su capacidad para penetrar cultivos profundos o de alta densidad. Por este motivo se recomienda el uso de luz roja o azul (Metsoviti *et al.*, 2019).

Una de las ventajas de trabajar bajo crecimiento mixotrófico en fotobiorreactor es por el uso de CO₂ como fuente de carbono inorgánico, ya que se ha observado una mayor densidad celular (Fields *et al.*, 2018). Por lo tanto, las microalgas *C. vulgaris* han generado un gran campo de investigación y muchas aplicaciones en cuanto a los metabolitos que sintetizan y el tipo de condición de crecimiento para su estudio. Sin embargo, se han realizado pocas investigaciones sobre los metabolitos secundarios y sobre cómo estos pueden aumentar su síntesis dependiendo de las condiciones de crecimiento, ya que estudios anteriores se han centrado en los productos del metabolismo primario. Así, investigar la presencia y producción óptima de estas moléculas con esta actividad puede contribuir al desarrollo de alternativas para los sectores energético, farmacéutico y alimentario, que fue el principal objetivo de la siguiente investigación (Yan *et al.*, 2016).

II. JUSTIFICACIÓN

El estudio en las cinéticas de *C. vulgaris* se ha centrado específicamente en la producción de metabolitos primarios como son los lípidos, los cuales son utilizados principalmente en la elaboración de biodiesel a nivel industrial; sin embargo, no se han investigado a profundidad sobre otros compuestos resultantes del metabolismo secundarios de la microalga (polifenoles y terpenos) para evaluar su aprovechamiento a nivel biotecnológico como lo pueden ser en alimentos funcionales con actividad antioxidante. De igual manera, se ha observado que las cepas de microalgas pueden responder de manera distinta a los medios de crecimiento en los que se encuentren en función de su estructura, por lo que, el analizar cepas mexicanas podría traer un aumento en la producción de metabolitos tanto primarios como secundarios a lo reportado en otras variedades a lo largo del mundo. Por otro lado, se ha observado que las microalgas responden de manera diversa a una amplia gama de factores con los que interaccionan durante su desarrollo; sin embargo, ha resultado complicado el saber cuál de ellos tiene un peso mayoritario al momento del crecimiento y sobre todo saber cuáles de ellos no son los suficientemente significativos como para no ser controlados, disminuyendo por tanto esfuerzo, tiempo y dinero en la producción y desarrollo de la microalga. Finalmente, con base a la bibliografía consultada, se ha observado que el principal problema para que las microalgas puedan llevar a cabo de manera eficiente la fotosíntesis es necesario un arreglo en el cual la intensidad de la luz y la trayectoria permita que se efectúe de manera uniforme; sin embargo, la mayoría de los dispositivos realizan el suministro de energía de manera externa en el dispositivo, por lo que se sugiere que para poder aumentar y optimizar la producción de metabolitos primarios y secundarios es necesario la construcción de un dispositivo que contenga una fuente de luz LED en el interior del medio de reacción y además se cuente con un dispositivo que permita detectar la cantidad de luz que está viajando a lo largo del medio para que las células reciban la misma cantidad de luz y la fotosíntesis sea eficiente.

2.1 IMPACTO

El principal impacto que se pretende generar es en la industria biotecnológica, ya que con la optimización del crecimiento de esta microalga se busca que tanto los metabolitos primarios como los metabolitos secundarios puedan ser aprovechados para elaboración de alimentos funcionales los cuales, por el diseño del fotobiorreactor, permiten asegurar inocuidad sobre la purificación de ellos así como controlar de mejor manera las condiciones operacionales y los rendimientos en los productos lo que llevaría a un posible escalamiento. Por otro lado, el impacto que se busca generar en manera particular se muestra a continuación.

2.1.1 Económico

La mayor problemática en el crecimiento de microalgas de manera sofisticada es que para poder tener una mayor control de los factores que influyen en su desarrollo el instrumentar los fotobiorreactores y su posterior escalamiento implica costos elevados que no resultan favorables al momento de hacer el balance con respecto de los metabolitos obtenidos y producción de biomasa por lo que con el diseño e instrumentación del fotobiorreactor se buscó aumentar la producción y construirlo con materiales accesibles como el material de vidrio Pyrex® para los vasos del fotobiorreactor y tapas de acero inoxidable, al igual que los diferentes sensores para el monitoreo de las cinéticas experimentales.

2.1.2 Ambiental

Uno de los beneficios que puede traer el desarrollo de este trabajo es que, como dentro de los metabolitos sintetizados por las microalgas se encuentran los lípidos y estos a su vez son transformados por un proceso químico llamado esterificación a biodiesel, el cual sirve como combustible, puede remplazar este producto el uso de combustibles fósiles convencionales (petróleos y derivados) disminuyendo el impacto de las emisiones de dióxido de carbono y así el sector energético pueda tener una alternativa para la sociedad. Por otro lado, gran parte del contenido de compuestos con actividades antioxidantes son extraídos de frutos los cuales implican una sobreexplotación de la tierra y gasto de recursos hídricos, por lo que el mantener el cultivo de microorganismo significaría una disminución en las fuentes convencionales de metabolitos además de que parte de los productos en la fotosíntesis es el O₂ el cual no representaría un riesgo en el manejo de residuos al igual que la biomasa ya que esta podría ser utilizada como compostaje una vez extraídos los compuestos de interés.

2.1.3 Social

Dentro de los beneficios que proporciona el desarrollo de este proyecto se puede mencionar que, el encontrar condiciones óptimas operacionales para la generación de biomasa de *C. vulgaris* puede traer consigo la obtención de fuentes importantes de metabolitos como proteínas, lípidos y carbohidratos, ya que se sabe que las proteínas sintetizadas por las microalgas son utilizadas para la generación de alimentos funcionales o suplementos alimenticios reportándose que al menos el 50% de la composición de las microalgas del género *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Arthospira*, entre otros contienen este metabolito primario y que además se considera que la proteína aislada a base de microalgas son de mejor calidad que las que se pueden obtener de cereales y leguminosas, por lo que encontrar condiciones que aumenten los rendimientos obtenidos a través de la biomasa trae consigo la elaboración de alimentos de calidad a menores costos.

En cuanto a los carbohidratos que se pueden obtener a partir de microalgas se pueden mencionar que estos se encuentran en forma de gránulos de almidón en el interior de la célula por lo que, o se pueden extraer mediante lisis o ruptura celular, o se pueden dejar contenidos en la biomasa obtenida. Los principales polisacáridos que se encuentran son polisacáridos similares a la amilopectina del almidón. Se presentan en dichos polisacáridos uniones glucosídicas de unidades de glucosa con enlaces α en los carbonos 1 y 4 así como ramificaciones entre carbonos 1 y 6. Dichos polisacáridos dan origen a lo que se conoce como el paramilón o la crisolaminarina (β -glucanos). El paramilón es utilizado principalmente como fuente de fibra dietética tanto en forma soluble como insoluble y produce, entre otras cosas, una disminución en la presión arterial, ayuda en el control de la hiperglucemia e hiperinsulinemia, control de obesidad, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer e hipertensión (Zeković *et al.* 2005).

Por su parte, los lípidos son utilizados para la generación de biocombustibles o para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que sirven para la formulación de alimentos funcionales de igual manera. Algunos de los lípidos presentes en las microalgas son; fosfolípidos, esteroides, lipoproteínas, glucolípidos y galactolípidos, a su vez, los ácidos grasos contenidos insaturados como poliinsaturados son; ácido araquidónico (AA), eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA). Estos ácidos grasos son esenciales para el buen funcionamiento cerebral, por lo que el desarrollar alimentos que contengan este tipo de metabolitos trae grandes beneficios para la salud (Aires *et al.*, 2005).

Finalmente, los pigmentos contenidos en las microalgas, como lo pueden ser aquellos correspondientes a los polifenoles, clorofilas o a los compuestos terpénicos (β -carotenos, licopeno, astaxantina y leteína) representan aproximadamente de 0.5 a 1% del peso seco de la biomasa (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015). Estos metabolitos han despertado el interés de la sociedad científica, ya que se ha reportado la actividad antioxidante que traer consigo el combatir o prevenir enfermedades degenerativas o inhibir efectos del paso del tiempo a nivel celular y que, además, en la industria de los alimentos representa el poder reemplazar a los antioxidantes sintéticos que pueden traer consigo efectos secundarios adversos (Kim *et al.*, 2011).

Por esta razón, el desarrollo de este proyecto trae múltiples beneficios a la sociedad para mejorar las actuales fuentes y desarrollo de alimentos funcionales o fármacos que aseguren o ayuden a una mejor calidad de vida.

III. OBJETIVO

“Establecer un modelo estadístico cinético para optimizar el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* a nivel fotobiorreactor”

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar un fotobiorreactor que se adecue a las condiciones generales de crecimiento de la microalga *C. vulgaris*.
2. Instrumentar el fotobiorreactor.
3. Aplicar un diseño experimental de cribado a nivel matraz para el crecimiento heterotrófico de *C. vulgaris* para identificar los factores que pueden tener peso en cinéticas experimentales a nivel fotobiorreactor.
4. Aplicar un diseño experimental con la metodología de Taguchi para la cinética de crecimiento de *C. vulgaris* evaluando como factores; tiempo de crecimiento, temperatura, pH, CO₂, concentración sustrato, así como tiempo de exposición a la luz (fotoperiodo).
5. Evaluar el peso de los factores en la cinética de crecimiento para determinar cuales tienen efecto significativo.
6. Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de la microalga en donde se tenga la mayor concentración de biomasa, rendimiento en consumo de sustrato y formación de productos con base al resultado estadístico de Taguchi.
7. Cuantificar metabolitos primarios y secundarios de *C. vulgaris* en diferentes etapas de crecimiento.
8. Analizar en qué etapa de la cinética se produce una mayor cantidad de metabolitos secundarios con actividad antioxidante para su aplicación tecnológica.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Las microalgas

Las microalgas representan una parte importante dentro de la biodiversidad del planeta donde, hasta el año 2014, se tenía la descripción de poco más de 40,000 especies. Las microalgas son pertenecientes al reino protista, el cual contiene a todos los organismos eucariontes que no entran dentro de la clasificación del reino fungí, animalia o plantae. Entre los géneros que se pueden encontrar en las microalgas se tiene a *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Stigeoclonium* y *Chlorella* siendo esta última la de interés para el presente trabajo donde se analizó el cultivo de *Chlorella* de la especie *vulgaris* perteneciente a la familia *Chlorellaceae* (Safi *et al.*, 2014).

5.2 Metabolismo

Las microalgas pueden ser organismo autotróficos o heterótrofos. El primer grupo es aquel en donde los organismos utilizan compuestos inorgánicos como fuente de carbono y que a su vez pueden ser fotoautótrofos; es decir que utilizan la luz como energía para obtención de compuestos igualmente energéticos que les sirvan para su desarrollo, o quimioautótrofos, es decir que mediante la oxidación de compuestos inorgánicos sintetizan moléculas energéticas. Dentro de las principales moléculas que se sintetizan a través de cualquier metabolismo se encuentra el almidón y los lípidos considerándose metabolitos primarios que son aquellos que se forman para las funciones principales del organismo, otro tipo de metabolito primario que de igual manera se sintetiza son las proteínas, las cuales se obtienen por el metabolismo de compuestos nitrados como el amonio. Por tanto, la composición química de las microalgas se ve influenciada directamente determinada la fuente de carbono que se use como sustrato para la síntesis de los metabolitos primarios (Ochoa *et al.*, 2011).

5.2.1 Metabolismo primario

La actividad metabólica de un microorganismo no siempre tiene como objetivo la proliferación celular; sin embargo, durante una curva de crecimiento con la cual se describe su desarrollo, el metabolismo primario es aquel que se lleva a cabo durante la fase exponencial asociado directamente con el crecimiento celular; sin embargo, cuando un microorganismo crece en un medio con nutrientes en exceso, consigue completar sus vías metabólicas generando los productos finales del metabolismo energético y todos los compuestos necesarios para su ciclo de vida (aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas, azúcares, grasas, alcoholes). Estas moléculas se denominan metabolitos primarios, y los más importantes, desde el punto de vista comercial, son los alcoholes (especialmente el etanol), los aminoácidos, los ácidos orgánicos, las vitaminas y las enzimas (García, 2004).

5.2.2 Metabolismos secundarios

El metabolismo secundario es aquel que se realiza una vez terminada la fase exponencial (etapa de mayor crecimiento microbiano), denominada fase estacionaria, donde se producen diferentes compuestos químicos que no son de vital importancia para la célula y que son llamados metabolitos secundarios. En los organismos fotosintéticos, es común encontrar compuestos con valor nutricional que sean aprovechados para la elaboración de productos alimenticios, como lo son los metabolitos primarios; sin embargo, es difícil que solo se tenga presencia de ellos ya que durante el desarrollo del organismo se sintetizan los metabolitos secundarios, como ya se había mencionado, que le ayudarán para su adaptación y preservación. Los metabolitos secundarios difieren entre especies vegetales y reflejan su evolución. Son metabolitos secundarios ya que no todas las plantas son capaces de sintetizarlos, o al menos no del mismo tipo o en las mismas concentraciones a diferencia de los metabolitos primarios; que se encuentran en todos los reinos y en las especies existentes en ellos (García, 2004).

Los metabolitos secundarios, han sido clasificados a lo largo de la historia de diversas maneras: por los grupos funcionales que contienen, así como por la posición del grupo funcional, por el efecto negativo que tienen en el aprovechamiento de algunos nutrientes, por la cadena carbonada que los conforma o por su configuración molecular (García, 2004); sin embargo, se pueden identificar 6 grupos principales que son: los alcaloides, los polifenoles, los terpenos, el látex, las gomas y las ceras (Vilela *et al.*, 2011).

Los alcaloides

Se trata de una familia con más de 15,000 compuestos químicos cuya característica principal es que: son solubles en agua, tienen actividad biológica y deben contener en su estructura química al menos un átomo de nitrógeno. Los alcaloides pueden ser moléculas cíclicas o alifáticas. La síntesis de los alcaloides es a partir de los aminoácidos: lisina, tirosina y triptófano (Ávalos *et al.*, 2009). Los alcaloides suelen ser tóxicos para quien llega a ingerirlos. Algunos de los ejemplos de alcaloides son los alcaloides: esteroidales, glicósidos, cianogénicos y aminas (Vilela *et al.*, 2011).

Terpenos o terpenoides

Conocidos también como terpenoides o isoprenoides, son moléculas que resultan de la unión de estructuras carbonadas con 5 átomos de carbono llamados isopreno, clasificándose con base a la cantidad de unidades de isopreno que conformen el metabolito. Por tanto, los terpenos se pueden clasificar en: hemiterpenos (5 carbonos), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) y politerpenos que en su estructura contiene 35 o más carbonos (Vilela *et al.*, 2011). Los terpenos son extraídos del material vegetal utilizando solventes orgánicos, ya que son moléculas no polares, y son extraídos en forma de aceite esencial conteniendo solo terpenos del tipo monoterpenos e incluso sesquiterpenos. Por otro lado, los terpenos de peso molecular mayor son extraídos del material vegetal en forma de resinas (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Latex

La composición química del látex es compleja ya que está constituido por terpenos, isoprenoides, grasas y carbohidratos. Las principales plantas que lo sintetizan son los angiospermas tropicales (Vilela *et al.*, 2011).

Gomas

Las gomas son carbohidratos complejos, de alto peso molecular, que pueden tener ramificaciones o no presentarlas y que son solubles en agua (Vilela *et al.*, 2011).

Ceras

Son mezclas complejas de cadenas carbonadas que poseen de 20 a 60 carbonos. Son compuestos insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos. Generalmente las ceras son sintetizadas por plantas de la familia de las Euphorbiaceae y Palmae (Vilela *et al.*, 2011).

Polifenoles

Los polifenoles, al igual que los terpenos, son de los compuestos químicos con mayor abundancia en la naturaleza. Se trata de compuestos con una gran diversidad estructural; sin embargo, presentan anillos aromáticos hidroxilados en común. La clasificación de los polifenoles se basa en: el número de grupos hidroxilo en la estructura, donde el fenol es la molécula más sencilla y puede estar sustituido con más de un radical hidroxilo, la siguiente forma de clasificación es con base a su composición química; es decir, con base al número de fenoles sencillos unidos en una molécula existiendo, por tanto, mono, di, oligo y polifenoles. Finalmente, la tercera clasificación es aquella en donde se toma en cuenta el sustituyente unido a la cadena base carbonada (Kabera *et al.*, 2014). Por ellos, los grupos en los cuales se pueden clasificar a los compuestos polifenólicos, con base en su estudio y utilidad, son: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, taninos, chalconas, cumarinas (Vilela *et al.*, 2011).

Ácidos fenólicos: están conformados por dos grupos: ácido hidroxibenzoico y derivados de ácidos hidroxicinámicos. Entre los ácidos hidroxibenzoicos se encuentra el ácido gálico, el ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico y siringico (Angelo *et al.*, 2007).

Flavonoides: se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, contenidos en las hojas, flores, partes leñosas, así como en las cortezas de los frutos. Las plantas que son expuestas a las radiaciones solares tienen una mayor concentración de estos compuestos que aquellas plantas que crecen a la sombra (Durán *et al.*, 1993). Los flavonoides son pigmentos solubles en agua, de bajo peso molecular, que se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y son responsables de las coloraciones amarillas, rojas y azules en los pétalos de las flores o en algunos frutos (Kabera *et al.*, 2014). Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los flavonoides se clasifican, con base a los sustituyentes que contenga la estructura base o a la posición y

numero de grupos hidroxilo en: flavanos, flavonoles, flavonas, isoflavonas y antocianidinas, las cuales se encuentran en forma de glicósidos constituidos por una fracción fenólica o aglicona y un carbohidrato (Aherne & O'Brien, 2002).

Taninos: son compuestos de alto peso molecular que en su estructura poseen al menos un grupo hidroxilo en uno o más anillos fenólicos que los constituyen. Son sintetizados a partir del ácido shikimico, son solubles en agua a excepción de aquellos que tienen un peso molecular elevado y se dividen en dos grupos: los taninos hidrolizables y los condensados (Kabera *et al.*, 2014). Los taninos hidrolizables están conformados por ésteres de ácido gálico o ácido elágico unidos a un carbohidrato; los taninos hidrolizables pueden ser hidrolizados fácilmente en presencia de un ácido fuerte. Dentro de los taninos hidrolizables se encuentra una subclasificación que incluye: galotaninos y los elagitaninos. Los galotaninos son considerados los taninos hidrolizables más simples, están formados por ácido gálico y el ácido digálico unidos por un enlace éster que, a su vez, se encuentran unidos a glucosa. Los elagitaninos se forman a partir del ácido hexahidroxidifénico que al hidrolizarse forma el ácido elágico. Los elagitaninos, así como los galotaninos tienen la actividad de polimerizarse, formando moléculas complejas. En cuanto a los taninos condensados, resultan de la polimerización de unidades de flavonoles; como lo es la catequina, la epicatequina o leucocianidina, sin presencia de algún carbohidrato (Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015).

La síntesis de los metabolitos secundarios está restringida a la etapa de desarrollo del organismo fotosintético, así como por factores como la concentración de carbohidratos, disponibilidad de agua, exposición a luz, y temperatura ambiental principalmente (García, 2004). Los metabolitos secundarios cumplen con las siguientes funciones en las plantas, las cuales son:

1. Mecanismo de defensa: las gomas son exudadas cuando el organismo fotosintético sufre algún corte de tal manera que ayude a la regeneración del tejido (Vilela *et al.*, 2011). En cuanto a los terpenos, los monoterpenos, como el mentol, citronelal y piretrinas son antimicrobianos, repelente de insectos y veneno que ataca el sistema nervioso de algún organismo letal para los seres fotosintéticos, respectivamente (Sepúlveda *et al.*, 2003).

2. Protección contra la radiación ultravioleta: para este sistema de protección, los polifenoles son los que cobran gran importancia ya que es sabido que compuestos como los flavonoides, cumarinas, ligninas y los taninos actúan como filtros para la luz UV, de tal manera que las plantas que estén expuestas mayoritariamente al sol, tienen una mayor síntesis de compuestos polifenólicos (Vilela *et al.*, 2011).

3. Alelopatía: se define como la inhibición del crecimiento de alguna especie de planta ajena por parte de otra que pueda interferir con su crecimiento. Los compuestos que generan este fenómeno actúan sobre la etapa de germinación, reduciendo: la actividad mitótica en las raíces, consumo de iones, fotosíntesis, permeabilidad de las membranas celulares, actividad enzimática (Céspedes *et al.*, 2006).

Con la caracterización de los metabolitos secundarios y el análisis sobre la funcionalidad que cumplen en las plantas, surgió el interés por el ser humano de extraer los compuestos, purificarlos y evaluar su aplicación biotecnológica, donde se ha concluido hasta el momento

que los metabolitos secundarios tienen algunas propiedades como: favorecedor de la salud cardíaca, actividad antiinflamatoria, actividad antitumoral, control de la diabetes y como agentes antioxidantes y bactericidas.

5.3 Actividad antioxidante

Un antioxidante es aquella sustancia que presenta bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable que retarda o previene su oxidación. Los antioxidantes estabilizan a los radicales libres y tienen la actividad de inhibir la oxidación causada por ellos actuando a nivel intracelular y otros en la membrana celular. A nivel de la biotecnología alimentaria, los antioxidantes son compuestos que al retardar o inhibir la degradación de las moléculas orgánicas ayudan a prevenir la formación de colores y olores desagradables (Wootton-Beard *et al.*, 2011).

Tipos de antioxidantes:

1. Endógenos: son enzimas producidas en el organismo y algunas de ellas necesitan algún cofactor para poder actuar y proteger a la célula.
2. Exógenos: son sustancias introducidas al organismo mediante la alimentación. Como ejemplos de estas antioxidantes tenemos a la vitamina E, C y el caroteno.

Por otro lado, los radicales libres son compuestos químicos producidos normalmente durante el metabolismo celular que se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, por las diversas reacciones redox, realizadas por enzimas como: la NADHP oxidasa, lipoxigenasas, cicloxigenasas y peroxidasas. Existen otras fuentes endógenas de radicales libres como las oxidaciones microsomales, los fagosomas, la autooxidación de sustratos y los neutrófilos. Los radicales libres son utilizados en diferentes procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos; sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas capaces de causar daño celular (Huang *et al.*, 2005).

El exceso de radicales libres es producido por contaminantes externos que entran a nuestro cuerpo; la contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos, así como el oxígeno. El oxígeno molecular (O_2) al usarse por los organismos aerobios contribuye a la formación de las especies reactivas de oxígeno (EROs o ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species) que son considerados radicales por carecer de electrones, tomándolos por lo tanto de otras moléculas. Al reducirse el O_2 por los electrones que escapan de la cadena respiratoria se genera el anión súper oxido (O_2^-), el cual puede dismutar fácilmente y formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre producen el radical hidroxilo (OH^\cdot), mediante la reacción de Fenton; considerado el más dañino en sistemas biológicos (Huang, 2005).

Con el análisis realizado al efecto que puede causar el exceso de radiales libre es que surge la necesidad de buscar fuentes naturales o artificiales de compuestos químicos con la capacidad de estabilizarlos y evitar o combatir el daño causado por ellos.

VI. ANTECEDENTES

Para este trabajo, dentro de los antecedentes que se pueden mencionar con respecto a la cuantificación de metabolitos secundarios se puede mencionar el trabajo realizado por Chinnasamy *et al.*, donde evaluaron el efecto en la producción de biomasa de *C. vulgaris* cuando es expuesta a elevadas concentraciones de CO₂ y temperaturas, todo esto evaluado en un medio de cultivo de aguas residuales en los que se observó un aumento en la concentración de clorofilas y biomasa con aumentos en el medio del 1% al 6% de CO₂ los cuales fueron aproximadamente en el contenido de clorofilas hasta un aumento aproximado del 200% bajo la condición en específico de un aumento en la concentración del 5% al 6% al igual que se pudo observar que en concentraciones por arriba del 7% existe una inhibición y muerte celular como a continuación se presenta en la Figura 1 (Chinnasamy *et al.*, 2009):

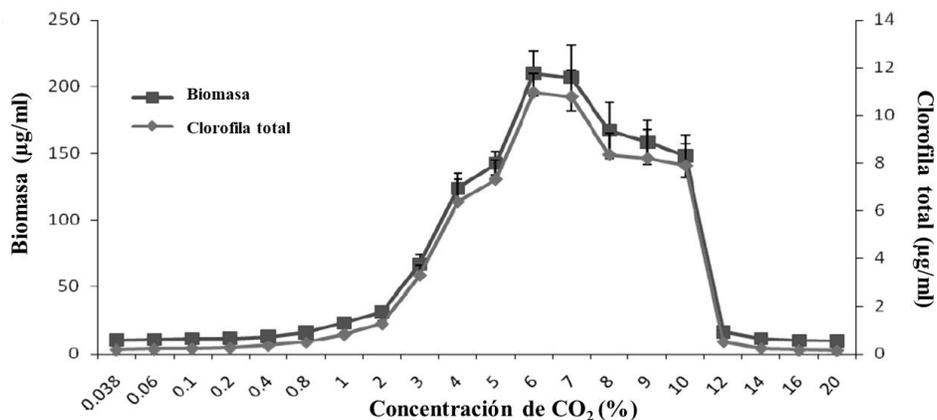


Figura 1. Concentración de biomasa y clorofilas con respecto de la variación de CO₂ en el medio de cultivo (tomado y modificado de Chinnasamy *et al.*, 2009).

Ahora con respecto en los aumentos de temperatura en un medio en donde se evaluaron 30 °C, 40 °C y 50 °C con concentraciones normales del medio los cuales son alrededor de 0.036% se observó una disminución al momento de aumentar las temperaturas ya que se registraron concentraciones de 0.128, 0.082 y no cuantificables expresando los resultados en µg/día. Por otro lado, en los mismos intervalos de aumento en las temperaturas, pero con una concentración en el medio del 6% el comportamiento fue similar registrándose valores de 0.222, 0.136 y 0.065 µg/día por lo que la temperatura comenzaba a afectar el sistema fotosintético de los microorganismos. Una vez identificadas las condiciones se probaron en cinéticas que se llevaron a cabo por 10 días y se comprobó los resultados son significativos y en los cuales se determinó la concentración de algunos pigmentos como los β-carotenos y las clorofilas. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la Figura 2:

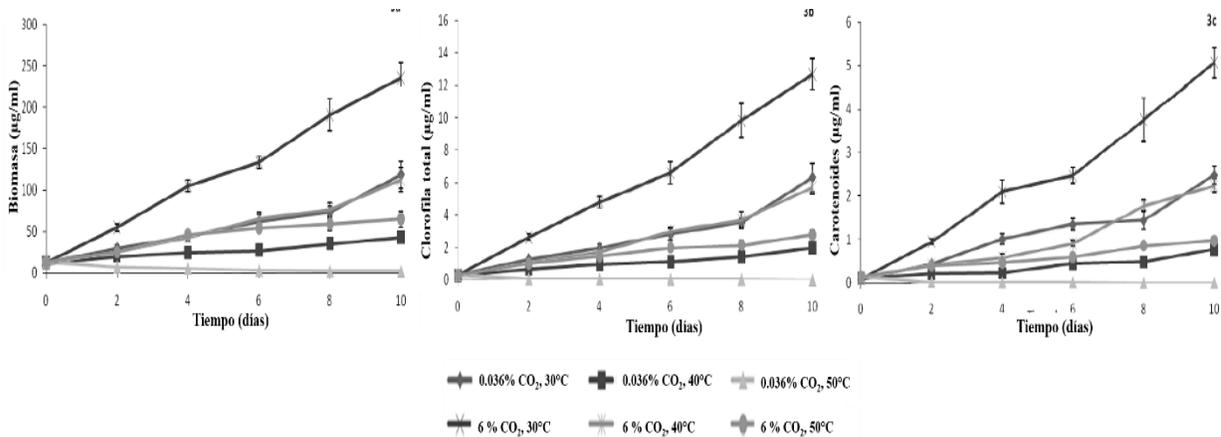


Figura 2. Efecto de la temperatura y CO_2 en el crecimiento celular y síntesis de pigmentos de *C. vulgaris* (tomado y modificado de Chinnasamy *et al.*, 2009).

Con el que se comprueba que la mayor producción de biomasa y pigmentos se ve favorecida a temperaturas de 30 °C con una concentración del 6% de CO_2 en el medio de cultivo.

Por otro lado, en el año 2011 fue realizado por Seyfabadi *et al.*, un trabajo en el cual se analizó el crecimiento de la microalga *C. vulgaris* con respecto a la exposición a la luz (fotoperiodo) y ver de esta manera si hay un efecto directo con respecto a la concentración de metabolitos primarios y secundarios como: proteínas, ácidos grasos y pigmentos. Los fotoperiodos evaluados fueron los siguientes: 8:16, 12:12 y 16:8 h (luz/oscuridad). Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente Figura 3.

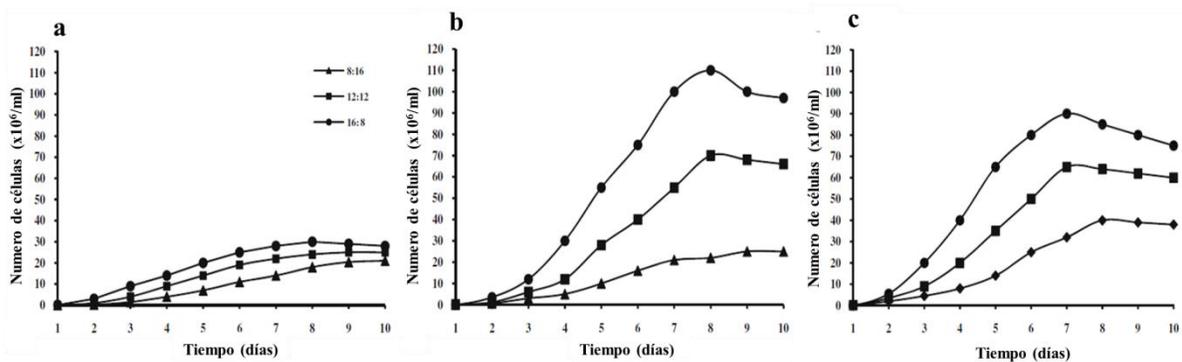


Figura 3. Concentración celular a diferentes fotoperiodos e intensidad de luz, donde para la figura (a) se utilizó una intensidad de 37.5 μmol de fotones/ m^2s , (b) de 62.5 μmol de fotones/ m^2s y (c) de 100 μmol de fotones/ m^2s (tomado y modificado de Seyfabadi *et al.*, 2011)

Con la Figura 3 se puede observar que a un fotoperiodo 12 horas de luz al igual que aquel de 16 h de luz hay un aumento significativo en la concentración de biomasa con respecto a lo observado en un fotoperiodo de 8 horas y que a la vez a una intensidad de luz de 62.5 μmol de fotones/ m^2s existe una mayor producción de biomasa. La disminución que se observa en el aumento de los fotoperiodos en la Figura 3(c) se puede explicar debido al fenómeno de fotooxidación dentro de la célula.

En cuanto a la cuantificación de metabolitos se observó que al haber aumento de la irradiación las concentraciones de clorofilas disminuyó y la concentración de β -carotenos aumento lo cual cobra sentido ya que son sintetizados como mecanismo de defensa y adaptación a exposición alta de luz por otro lado también el aumento de la irradiación disminuyo con respecto de los tratamientos en los cuales no hubo una cantidad elevada de luz debido a que este factor acelera el crecimiento celular; sin embargo esto no quiere decir que aumente la síntesis de pigmentos por lo que la acumulación no es proporcional al aumento de tamaño en la célula. Lo que respecta a la síntesis de proteína, se pudo observar que en los fotoperiodos más largo y con mayor intensidad hubo una mayor presencia de proteínas ya que en el foto periodo de 16:8 a una intensidad de 100 μmol de fotones/ m^2s se tuvo una concentración de 46% de proteína con respecto a la composición celular para lo que los factores juegan un papel importante según sea el tipo de metabolito que se tenga de interés.

Son pocos los trabajos que se tiene en cuanto a la determinación de compuestos con actividad antioxidante en microalgas de la especie *C. vulgaris* por lo que cobra importancia en que dentro de este proyecto se tome en cuenta este rubro.

Por otro lado, dentro de los metabolitos identificados y de los que se ha realizado la extracción en la biomasa generada se tiene el trabajo realizado por Dineshkumar *et al.*, en el año 2016 donde se realizó la extracción de metabolitos en *C. vulgaris* para evaluar su actividad antibacteriana frente a patógenos humanos. Dentro de los metabolitos secundarios que se buscó identificar fueron; fenoles, taninos, flavonoides, terpenos, terpenoides, alcaloides y saponinas, las cuales fueron extraídas de la biomasa al estar en contacto con solventes como; metanol, etanol, cloroformo y dietil éter para posteriormente analizar su efectividad en la inhibición o muerte de bacterias gram positivas y negativas patógenas para el ser humano. Como parte de los resultados se obtuvo que hay presencia en la biomasa de; proteínas (34.56 mg/g), carbohidratos (41.09 mg/g), clorofila total (32.76 mg/g), carotenoides (29.63 mg/g), y lípidos (28.20 mg/g) así como se logró detectar que, con extracción con metanol como solvente, es posible tener una señal para compuestos polifenólicos, flavonoides, terpenos y alcaloides. Con etanol no se detectó ninguna señal correspondiente a algún metabolito secundario. Con cloroformo se logró detectar flavonoides y alcaloides, así como al usar dietil éter. De igual manera se logró comprobar que de todos los extractos obtenidos, los extractos metanólicos son efectivos contra todas las bacterias patógenas evaluadas dentro de las cuales se mencionan *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus* sp, entre otras. Por tal razón es posible extraer una gama importante de metabolitos secundarios con impacto biotecnológico haciéndolo de manera selectiva y eficiente con extracción con solventes que, además de bajos costos, tiene como ventaja que la gran mayoría no son considerados altamente tóxicos para poder ser utilizados en formulación de productos una vez purificados y con la eliminación del solvente de extracción.

En cuanto al diseño y construcción de fotobiorreactores se realizaron búsquedas ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) para verificar si no existe alguna invención como la que se propone para este trabajo y se han encontrado los siguientes;

Dispositivo de iluminación para biorreactores” (Lehr, consulta 2021) con el que, debido a una distribución de luz muy homogénea de alta intensidad en el fotobiorreactor cilíndrico se consigue mediante diodos emisores de luz SMD (tecnología de dispositivos de superficie), con los que se monta directamente al equipo, que es diseñado como una placa de circuito impreso. El montaje directo junto con el diseño compacto de los LED SMD permite un montaje muy denso. Con el dispositivo de iluminación externo en las paredes transparentes del reactor, se puede lograr una distribución de luz casi homogénea dentro del reactor.

Por otro lado, se encontró el trabajo “Carbon neutralization system (CNS) for CO₂ sequestering” (Aramco services co & saudi arabian oil co, consulta 2021). Donde la invención se refiere a un fotobiorreactor con diodos emisores de luz pulsante (LED) para la fotofijación rentable de dióxido de carbono (CO₂). Los LED emiten luz de foco estrecho a una longitud de onda de 660 nm para optimizar la captura de dióxido de carbono y minimizar los costos de energía. También se puede mencionar el trabajo titulado "Cylinder type multilayered fotobiorreactor" (INHA IND PARTNERSHIP INST, consulta 2021), donde se propone un multifotobiorreactor cilíndrico para el cultivo masivo de microalgas. La presente invención se refiere a un fotobiorreactor para el cultivo masivo de microalgas que utiliza una placa como fuente de luz en forma de círculo, o circular, que consiste en un diodo emisor de luz (LED), un diodo emisor de luz orgánico (OLED) y un diodo emisor de luz (LED) flexible, que son delgados para minimizar el volumen y son altamente eficientes energéticamente. El objeto de la invención es proporcionar un fotobiorreactor cilíndrico que sea más delgado que una fuente de luz como una lámpara LED esférica o una lámpara fluorescente, que tenga una alta productividad por volumen y que pueda satisfacer varias condiciones de aplicación. La fuente de luz cilíndrica está hecha de un LED flexible (diodo emisor de luz flexible). Además, la fuente de luz cilíndrica se puede apilar una o más en la cámara de reacción.

Finalmente, se puede hacer mención del trabajo “Fotobiorreactor con deflectores integralmente proporcionados con fuente de luz interna para el cultivo de microalgas de alta densidad” (Sin titular, consulta 2021) donde la invención se relaciona con un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas en alta concentración para mejorar la eficiencia de agitación de una fuente de luz interna hecha de un LED (diodo emisor de luz) para mejorar la eficiencia de utilización de la luz y la biomasa de gas y microalgas. La presente invención se refiere a un fotobiorreactor en el que se forma integralmente un deflector para maximizar la eficiencia del cultivo microbiano.

Con los registros y diseños anteriores se analizó la oportunidad y viabilidad para la construcción de un fotobiorreactor que ayude a mejorar los parámetros cinéticos microbianos de microalgas.

VII. METODOLOGÍA

Las cepas de *C. vulgaris* fueron obtenidas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, Baja California Sur, México, y en el cual, para su mantenimiento y conservación, se realizó el crecimiento bajo un medio llamado 3N-BBM+V, el cual contienen micro y macronutrientes. Como micronutrientes se tiene; N P-IV Na₂EDTA (2 mM), FeCl₃·6H₂O (0.36 mM), MnCl₂·4H₂O (0.21 mM), ZnCl₂·6H₂O (0.037 mM), CoCl₂·6H₂O (0.0084 mM) y Na₂MoO₄·2H₂O (0.017 mM). Como macronutrientes se tiene; NaNO₃ (8.82 mM), CaCl₂·2H₂O (0.17 mM), MgSO₄·7H₂O (0.3 mM), K₂HPO₄·3H₂O (0.43mM), KH₂PO₄ (1.29 mM), NaCl (0.43 mM).

Debido a que el medio de mantenimiento no genera un crecimiento significativo de microalgas en un lapso de tiempo corto, se ha modificado este medio para lograr que se tenga un aumento en el número de células y con ello poder realizar inóculos a nivel fotobiorreactor bajo una concentración inicial de 50x10⁶ células/mL. Dicha modificación consiste en agregar NaNO₃ al 10 mM con una exposición de 16 h de luz y 8 horas de oscuridad bajo una fuente luminosa en el rango del color rojo cuya intensidad es aproximada de 1500 luxes. Con ello se ha conseguido tener concentraciones de hasta 900 células/mL aproximado a lo largo de un periodo de 15 días y con lo que se asegura tener la cantidad necesaria para poder realizar las cinéticas a nivel fotobiorreactor.

7.1 Desarrollo experimental a nivel matraz

Con los inóculos a la concentración celular deseada (50x10⁶ células/mL) se realizaron cinéticas de crecimiento a 15 días bajo un diseño de experimentos de cribado 2² a 6 corridas experimentales con dos puntos centrales, en donde las variables independientes son: la concentración de acetato de sodio o glicerol (consumo de sustrato), para acetato de sodio se trabajó con concentraciones de 0.0005 g/L, 0.001 g/L y 0.0015 g/L y para glicerol fue de 0.27 g/L, 0.33 g/L y 0.44 g/L, así como los fotoperiodos, los cuales son de 8 h luz y 16 h oscuridad (8:16), el segundo fotoperiodo es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (16:8). Para esta condición experimental se trabajó bajo crecimiento fotoheterotrófico; es decir, con una fuente de carbono orgánica (glicerol o acetatos) y sin presencia de fuentes inorgánicas de carbono como lo es CO₂. Como parte del diseño de experimentos se tomaron como variables de respuesta; crecimiento celular por método de conteo en cámara de Neubauer, biomasa por peso seco, consumo de sustrato (por titulación potenciométrica para acetato de sodio y pruebas enzimáticas para glicerol), pH y actividad antioxidante mediante la estabilidad de los radicales de ABTS^{•+} y DPPH[•]. Para un mejor entendimiento y descripción a continuación, se muestran las especificaciones de cada uno de los parámetros a medir para con ellos realizar la caracterización cinética microbiana de la microalga y además establecer las condiciones óptimas de crecimiento en *C. vulgaris* que además permitan obtener los mejores rendimientos en cuanto a productos generados con actividad antioxidante que tengan una posible aplicación a nivel biotecnológico.

- A) Crecimiento celular:** Para analizar la formación de nuevas células durante la cinética, se realizó un conteo bajo microscópico con cámara Neubauer de campo claro en el objetivo No. 40, donde no fue necesario realizar tinción con algún colorante como el azul de metileno a las células ya que es posible distinguir las células viables de aquellas con la pared celular dañada por el color verde intenso que presentan (Zhang *et al.*, 2020).
- B) Biomasa:** se determinó este parámetro bajo la técnica de peso seco donde, con ayuda de bandejas de aluminio a peso constante (peso inicial), se colocó 1 mL de muestra para someterse a calor en un horno eléctrico durante 24 horas a una temperatura de 60 °C para que, transcurrido el tiempo, se vuelva a pesar la bandeja (peso final) con la muestra y, por diferencia de pesos (peso final- peso inicial), se pueda calcular el peso de las células tomadas en la muestra por mililitro de medio de cultivo (González-Hernández *et al.*, 2017).
- C) Consumo de sustrato:** el cálculo de los equivalentes consumidos de acetato de sodio se realizó bajo una técnica de titulación potenciométrica en la cual debe construir una curva de calibración con NaOH y HCl con el fin de establecer la relación de esta base en el medio de crecimiento de las microalgas, ya que a medida que pasa el tiempo el medio se basifica y por ello, un consumo de HCl para neutralizar el medio puede generar el cálculo del consumo de acetato de sodio, ya que el ion acetato es metabolizado por las microalgas y los iones sodio dirigidos a la formación de NaOH (Ke *et al.*, 2016). Para la cuantificación de glicerol se realizó una curva de calibración por una técnica enzimática donde se llevó a cabo la reducción de NAD y que esta reacción es proporcional a las concentraciones de moléculas de glicerol presentes en el medio, para esto es necesario el preparar una solución de concentración conocida de glicerol y someterla a reacciones de fosforilación y reducción hasta lograr un aumento en la luz absorbida por las moléculas de NAD presentes en la reacción.
- D) pH:** se realizó la lectura del pH tomando el tiempo cero como el pH de referencia. Para esto es necesario un potenciómetro de la marca HANNA Instrument modelo HI 2211 pH/ORP Meter y para el cual se necesitó un volumen de muestra de 5 mL que se almacenó en tubos falcón de 25 mL.
- E) Actividad antioxidante:** Para la cuantificación de los productos formados se realizó la técnica ABTS^{•+} y DPPH[•], que mide indirectamente la cantidad de compuestos polifenólicos (en su mayoría) con dicha actividad. Para ello, la rotura celular se realizó con perlas de vidrio realizando lavados previos con agua desionizada bajo centrifugadora a 4000 rpm durante 5 minutos, esta operación se ejecutó tres veces para eliminar las sales disueltas en el medio. El volumen de agua desionizada utilizada en el lavado fue de 1 ml. Una vez lavadas las células, se puso en contacto con las perlas de vidrio suspendidas en 1 ml de agua desionizada en una centrífuga a 4000 rpm para posteriormente tomar el sobrenadante y evaluar la estabilidad de los radicales sintéticos de ABTS^{•+} y DPPH[•]. Sobre el método ABTS^{•+}, se preparó una solución radical ABTS^{•+} a una concentración de 7 mM, una solución acuosa de persulfato de amonio a una

concentración de 2.5 mM y una existencia de Trolox a una concentración de 80 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Posteriormente, se realizó una curva de calibración en equivalentes de Trolox ($\mu\text{M}/\text{ml}$) bajo una longitud de onda de 734 nm. Una vez construida la curva de calibración, se calculó el porcentaje de inhibición del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ cuando estaba en contacto con la solución de Trolox y también se calculó la concentración en equivalentes de Trolox. Para la determinación de la actividad de la muestra, se diluyó un volumen de 10 μL de muestra con 990 μL de solución $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ajustada, se realizaron las lecturas y cálculos correspondientes para expresar los resultados en equivalentes de Trolox g/L (Damian-Reyna *et al.*, 2018). En el método DPPH^{\bullet} se preparó una solución radical de DPPH^{\bullet} a una concentración de 0.046 g/L y una existencia de Trolox a una concentración de 80 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Posteriormente, se realizó una curva de calibración en equivalentes de Trolox ($\mu\text{M}/\text{ml}$) bajo una longitud de onda de 515 nm. Una vez construida la curva de calibración, se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH^{\bullet} cuando estaba en contacto con la solución de Trolox y también se calculó la concentración en equivalentes de Trolox. Para la determinación de la actividad de la muestra, se diluyó un volumen de 100 μL de muestra con 3900 μL de solución DPPH^{\bullet} ajustada, se realizaron las lecturas y cálculos correspondientes para expresar los resultados en equivalentes de Trolox g/L (Damian-Reyna *et al.*, 2018).

A continuación, en la Figura 4 se presenta de manera esquematizada la metodología aplicada para las cinéticas microbianas a nivel matraz.

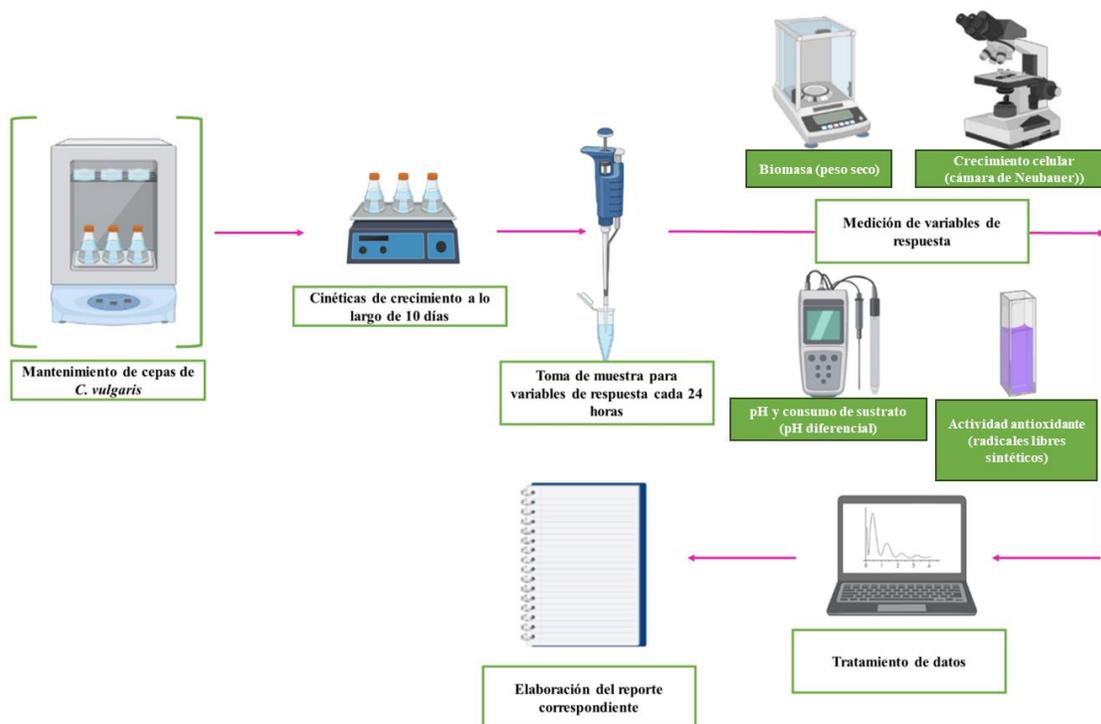


Figura 4. Diagrama de flujo operacional para las cinéticas experimentales de *C. vulgaris* a nivel matraz con acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) y glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) como sustratos orgánicos. Medio fotoheterotrófico.

7.2 Desarrollo experimental a nivel fotobiorreactor

En cuanto a la experimentación a nivel fotobiorreactor y, una vez los inóculos a la concentración celular deseada 50×10^6 células/mL, se realizaron cinéticas de crecimiento a 10 días bajo un diseño de experimentos de Taguchi L4 (2^2) en donde las variables independientes fueron: la concentración de NaNO_3 , siendo de 3.4 mM y 16.4 mM, así como los fotoperiodos, los cuales fueron de 8 h luz y 16 h oscuridad (8:16), el segundo fotoperiodo es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (16:8). Se realizaron inyecciones de CO_2 cada 24 horas por un tiempo de 20 s a un flujo de 5 mg/mL de tal manera que se tenga un crecimiento mixotrófico y no se acidifique el medio, ya que si esto ocurre puede causar el cese del crecimiento celular e incluso la muerte microbiana. Para el diseño de experimentos se tomaron como variables de respuesta; crecimiento celular por método de conteo en cámara de Neubauer, biomasa por peso seco, consumo de sustrato por absorción luminosa de los iones nitrato en los medios de crecimiento, pH, oxígeno disuelto en el medio, y actividad antioxidante mediante la estabilidad de los radicales de ABTS^{++} y DPPH^{\cdot} . Para un mejor entendimiento y descripción a continuación se muestran las especificaciones de cada uno de los parámetros a medir para con ellos realizar la caracterización cinética microbiana de la microalga y además establecer las condiciones óptimas de crecimiento en *C. vulgaris* que permitan obtener los mejores rendimientos en cuanto a productos generados con actividad antioxidante que tengan una posible aplicación a nivel biotecnológico.

- A) **Crecimiento celular:** Para analizar la formación de nuevas células durante la cinética, se realizó un conteo bajo microscópico con cámara Neubauer de campo claro en el objetivo No. 40, donde no es necesario realizar tinción con algún colorante como el azul de metileno a las células ya que es posible distinguir las células viables de aquellas con la pared celular dañada por el color verde intenso que presentan (Zhang *et al.*, 2020).
- B) **Biomasa:** se determinó este parámetro bajo la técnica de peso seco donde, con ayuda de bandejas de aluminio a peso constante (peso inicial), se coloca 1 mL de muestra para someterse a calor en un horno eléctrico durante 24 horas a una temperatura de 60 °C para que, transcurrido el tiempo, se vuelva a pesar la bandeja (peso final) con la muestra y, por diferencia de pesos (peso final- peso inicial), se pueda calcular el peso de las células tomadas en la muestra por mililitro de medio de cultivo (González-Hernández *et al.*, 2017).
- C) **Consumo de sustrato:** para analizar la cantidad de sustrato orgánico que consume la microalga y que es transformado en metabolitos primarios y secundarios se llevó a cabo la construcción de una curva de calibración de concentraciones conocidas de NaNO_3 que va de 0 a 50 mM, y en donde a través de las lecturas de absorbancia mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 301 nm es posible cuantificar la cantidad de iones nitrato disueltos en el medio de reacción, con ello se puede establecer cuanto nitrato está disponible en el medio y que se traduce a sustrato no consumido por la microalga.
- D) **pH:** se realizará la lectura del pH tomando el tiempo cero como el pH de referencia. Para esto será necesario un potenciómetro de la marca HANNA Instrument modelo

HI 2211 pH/ORP Meter y para el cual se requerirá un volumen de muestra de 5 mL que se contendrá en tubos falcón de 25 mL.

- E) **Concentración de oxígeno disuelto:** a través del sensor *Oxygen*, marca ROOT modelo SEN0237-A, se registró en tiempo real el oxígeno disuelto el cual debe de estar por debajo de 30% en el medio. Dicho sensor esta calibrado para una saturación en el medio dependiendo de la agitación de este.
- F) **Actividad antioxidante:** Para la cuantificación de los productos formados se realizó la técnica ABTS^{•+} y DPPH[•], que mide indirectamente la cantidad de compuestos polifenólicos (en su mayoría) con dicha actividad. Para ello, la rotura celular se realizó con perlas de vidrio realizando lavados previos con agua desionizada bajo centrifugadora a 4000 rpm durante 5 minutos, esta operación se ejecutó tres veces para eliminar las sales disueltas en el medio. El volumen de agua desionizada utilizada en el lavado fue de 1 ml. Una vez lavadas las células, se puso en contacto con las perlas de vidrio suspendidas en 1 ml de agua desionizada en una centrífuga a 4000 rpm para posteriormente tomar el sobrenadante y evaluar la estabilidad de los radicales sintéticos de ABTS^{•+} y DPPH[•]. Sobre el método ABTS^{•+}, se preparó una solución radical ABTS^{•+} a una concentración de 7 mM, una solución acuosa de persulfato de amonio a una concentración de 2.5 mM y una existencia de Trolox a una concentración de 80 µM/ml. Posteriormente, se realizó una curva de calibración en equivalentes de Trolox (µM/ml) bajo una longitud de onda de 734 nm. Una vez construida la curva de calibración, se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} cuando estaba en contacto con la solución de Trolox y también se calculó la concentración en equivalentes de Trolox. Para la determinación de la actividad de la muestra, se diluyó un volumen de 10 µL de muestra con 990 µL de solución ABTS^{•+} ajustada, se realizaron las lecturas y cálculos correspondientes para expresar los resultados en equivalentes de Trolox g/L (Damian-Reyna *et al.*, 2018). En el método DPPH[•] se preparó una solución radical de DPPH[•] a una concentración de 0.046 g/L y una existencia de Trolox a una concentración de 80 µM/ml. Posteriormente, se realizó una curva de calibración en equivalentes de Trolox (µM/ml) bajo una longitud de onda de 515 nm. Una vez construida la curva de calibración, se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH[•] cuando estaba en contacto con la solución de Trolox y también se calculó la concentración en equivalentes de Trolox. Para la determinación de la actividad de la muestra, se diluyó un volumen de 100 µL de muestra con 3900 µL de solución DPPH[•] ajustada, se realizaron las lecturas y cálculos correspondientes para expresar los resultados en equivalentes de Trolox g/L (Damian-Reyna *et al.*, 2018).

Como se mencionó al inicio de este apartado, se llevaron a cabo inyecciones de CO₂ al medio cada 24 h en un lapso de 20 s con la finalidad de aportar al medio una fuente de carbono inorgánico y promover el crecimiento celular pero, a la vez, con la inyección del gas por medio de un difusor de acero inoxidable generador de burbujas intensas se pudo generar una turbulencia que permitió mezclar y homogenizar el medio a la hora de la toma de muestra y evitar precipitación de microalgas que provocara un conteo bajo de células.

Para esquematizar de manera sencilla la metodología empleada a continuación, se presenta el diagrama de flujo de las diferentes operaciones involucradas en el proceso.

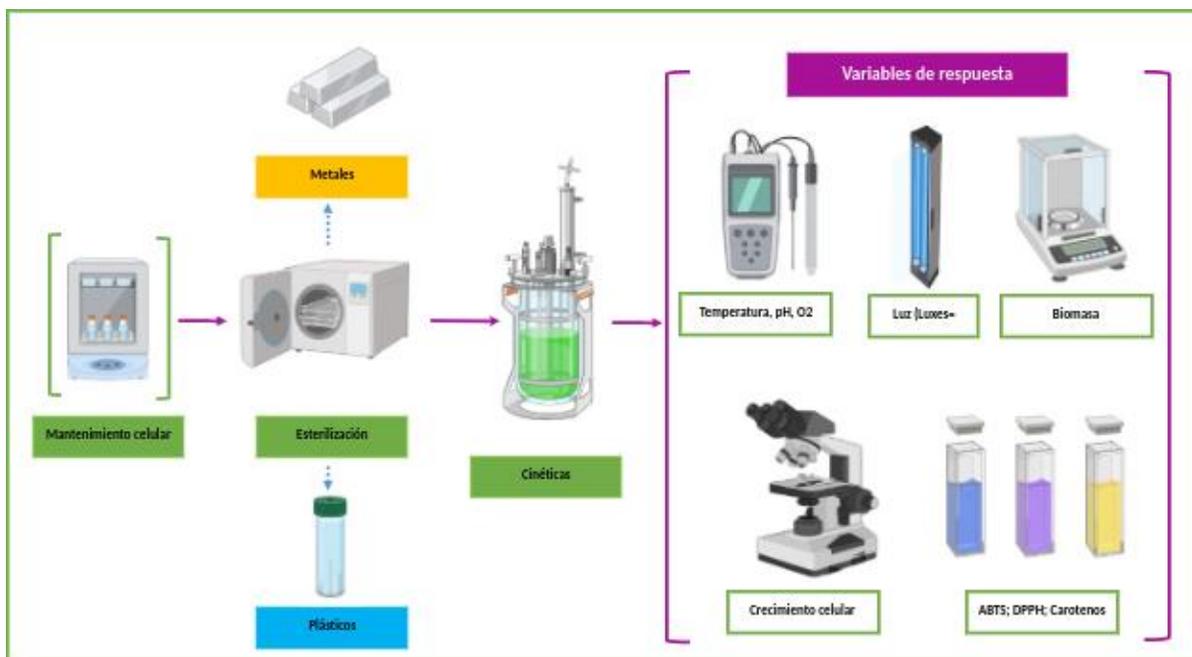


Figura 5. Diagrama de flujo operacional para las cinéticas experimentales de *C. vulgaris* a nivel fotobiorreactor con nitrato de sodio (NaNO_3) como sustrato orgánico y CO_2 como sustrato inorgánico. Medio mixotrófico.

VIII. RESULTADOS

8.1 Diseño, maquinado y construcción de fotobiorreactor

8.1.1 Diseño mecánico

Dentro de la propuesta de construcción del fotobiorreactor se puede mencionar que está conformado por dos tapas de acero inoxidable las cuales se denominarán “tapa A” y “tapa B” o tapa de acero inoxidable. La tapa A está soldada a un soporte de acero inoxidable el cual cuenta con cuatro varillas que darán soporte y estabilidad al fotobiorreactor. La tapa A recibirá un recipiente de vidrio Pyrex® en el que contendrá la microalga con todos los nutrientes y demás factores abióticos que favorecen su crecimiento. Una vez colocado el recipiente, se coloca la tapa B sobre el recipiente de vidrio, el cual cuenta con una pluralidad de sensores que miden el pH, temperatura, oxígeno, así como un difusor de CO₂, elementos para la toma de muestras y en su centro la fuente de luz LED. Los sensores están conectados, como se describió anteriormente, a la tarjeta de adquisición de datos del sistema embebido, lo que permite monitorear en tiempo real las señales eléctricas en el medio de cultivo, lo que lo diferencia de otros desarrollados anteriormente. A continuación, la Figura 6 muestra los componentes que componen el fotobiorreactor.

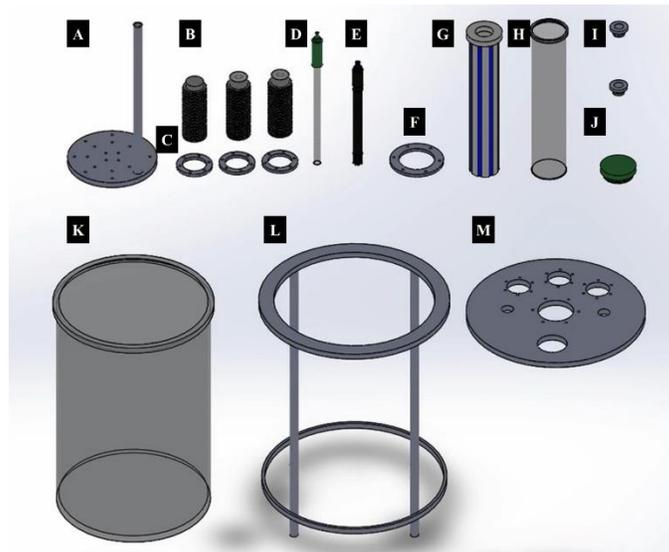


Figura 6. Fotobiorreactor de crecimiento de microalgas con monitoreo en tiempo real de: pH, temperatura y oxígeno disuelto (O₂), control de intensidad lumínica. (A) Difusor. (B) Soporte para sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto. (C) Tapas de sensores (B). (D) sensor de pH. (E) Sensor de oxígeno disuelto. (F) Cubierta de fuente de luz LED azul. (G) Fuente de luz LED azul. (H) Recipiente interno para fuente de luz. (I) Tapones de PLA para toma de muestras e inyección de CO₂. (J) Tapón de PLA para futuros accesorios. (K) Recipiente externo para medio de crecimiento de microalgas. (L) Soporte para fotobiorreactor de 4 postes. (M) Cubierta de acero inoxidable.

La cubierta M está destinada a la bodega del medio de cultivo de microalgas, así como a la colocación de todos los accesorios (sensores de oxígeno disuelto, temperatura, pH, manguera de muestreo, manguera de entrada de dióxido de carbono que conectará con un difusor y finalmente la fuente de luz LED). En el centro de la tapa B, se colocó la fuente de luz LED azul, que proporciona la energía lumínica necesaria para realizar la fotosíntesis y donde se puede variar el tipo de fotoperiodo además de la intensidad.

A través del programa de interfaz gráfica, es posible modular la intensidad de la luz de tal manera que pueda adaptarse al tipo de microalga que se pretende cultivar, ya que no todas las variedades de estos seres fotosintéticos reaccionan de la misma manera a la exposición a la luz, que no imita su uso a un solo tipo de microalgas.

Finalmente, se puede mencionar que la matriz de luces LED de la Figura 6 se insertó en un tubo de vidrio Pyrex® llamado "tubo interno" el cual lo protege de daños debido a la inmersión de la fuente de luz en el medio de cultivo, lo que provocaría un corto circuito. A su vez, este tubo interno se coloca dentro de un "recipiente externo" con una capacidad de 10 L del mismo material (vidrio Pyrex®) que contendrá el medio de crecimiento de las microalgas, contendrá un difusor para la microburbuja de CO₂, la microalga y sensores para la detección de señales bioquímicas.

Una vez diseñado el fotobiorreactor, la adquisición de los diferentes sensores, así como los materiales de acero inoxidable, vidrio Pyrex® y la tarjeta de adquisición de datos del sistema embebido, se inició la fábrica y la instrumentación.

8.1.2 Instrumentación

Para detectar las variaciones de respuesta en el fotobiorreactor y traducirlas fue necesario adquirir la tarjeta del sistema embebido que, a través del voltaje medido por sensores de pH, temperatura, oxígeno disuelto e intensidad de luz, es posible monitorear las condiciones en tiempo real.

La tarjeta del sistema incorporado es una entrada analógica (AI), salida analógica (AO), entrada y salida digital. Esta tarjeta se conecta al ordenador de alimentación a través de USB y conexión inalámbrica (WiFi). Los conectores de cuenta A y B del puerto de expansión (MXP). Ya dentro del programa gráfico se distinguen las señales con el nombre del conector CONNECTORA/DIIO1 y CONNECTORB/DIIO1. Los conectores o entradas analógicas pueden trabajar en un rango de 0 a 10 voltios, lo que conecta los sensores necesarios para el fotobiorreactor.

Una vez recomfortada la tarjeta y conectada a una computadora la cual a través de la interfaz gráfica del programa se le podía mostrar el voltaje detectado con múltiples sensores los cuales eran los siguientes.

Termopar

El termopar utilizado tiene conexiones marca CEIV con diámetro de bulbo de 3/6" y extensión de cable de 1 m, su revestimiento es de fibra de vidrio y el revestimiento exterior del cable es de malla metálica que puede resistir temperaturas de hasta 5000 °C. Para realizar la conexión del termopar fue necesario diseñar y construir el circuito para detectar la variación de voltaje en la tarjeta del sistema embebido para lo cual se utilizó el siguiente diseño para la construcción de la placa electrónica de la Figura 7.

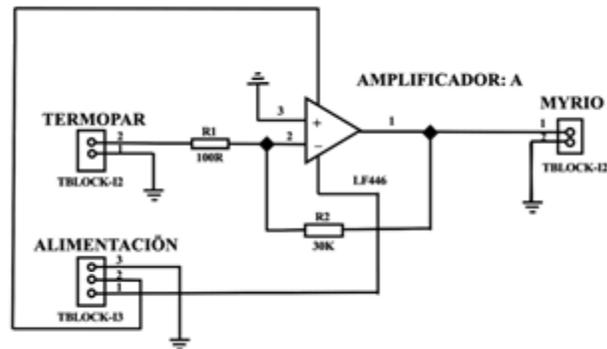


Figura 7. Circuito diseñado para conexión de termopar y tarjeta de adquisición de datos del sistema embebido en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas.

El termopar es alimentado por la fuente de alimentación a 24 voltios y desde este sensor se conectan en serie los demás sensores utilizados en el fotobiorreactor.

Electrodo para oxígeno disuelto (O_2)

El sensor utilizado para la detección de oxígeno disuelto en medio acuoso fue un sensor de oxígeno disuelto SEN0237-A de la marca DFROBOT compatible para Arduino el cual contiene 3 conexiones; GND, VCC y una salida analógica, su rango de detección es de 0 a 20 mg/L. Las conexiones son de tipo BNC y funciona a 5 voltios. A través de este sensor es posible realizar las mediciones en mg/L y %. Por otro lado, este sensor ya cuenta con su tarjeta electrónica de fábrica por lo que no es necesario el diseño de la circuitería, por lo que únicamente se realizó la conexión directamente al puerto CONNECTORB/DIIO1 para su calibración en el programa gráfico y posteriormente su validación.

Electrodo para pH

Este electrodo es de la marca HANNA Instruments modelo HI 2211 pH/ORP Meter que fue calibrado con tampones comerciales de la marca SIGMA para pH de 4 y 7. Funciona a 12 voltios y cuenta con entrada analógica BNC compatible con la tarjeta de adquisición de datos. Para la instrumentación se conectó directamente este sensor al puerto CONECTORB/DIIO1 de la tarjeta, así como una fuente de alimentación a 24 volts, la cual alimenta a todos los sensores del fotobiorreactor, una vez conectados se registraron las variaciones de voltaje a través del programa de interfaz gráfica y con ellas se construyó una curva de calibración que se describirá más adelante para poder hacer las lecturas en tiempo real del pH.

Intensidad de luz

Para la fuente de luz LED del fotobiorreactor fue necesario diseñar y construir la placa electrónica con la cual se realizará la variación de intensidad lumínica (Luxes) a través del programa gráfico, por lo que a continuación se presenta el diagrama correspondiente en la Figura 8.

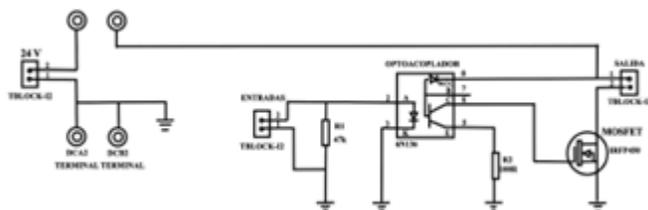


Figura 8. Circuito diseñado para la conexión de la fuente de luz LED y la tarjeta de adquisición de datos del sistema integrado en el fotobiorreactor para controlar la intensidad de la luz medida en Luxes durante el crecimiento de las microalgas.

La tarjeta eléctrica de la fuente de luz LED se conectó directamente al puerto N de la siguiente Figura 9 y de esta forma la variación la pudo realizar el usuario a través del programa gráfico.

8.1.3 Configuración experimental

Diseño

Cada una de las partes que componen el fotobiorreactor fueron ensambladas y conectadas a los distintos sensores para su validación y comenzar con la cinética de crecimiento exploratoria. La disposición del equipo fue la siguiente como se muestra en la Figura 9.

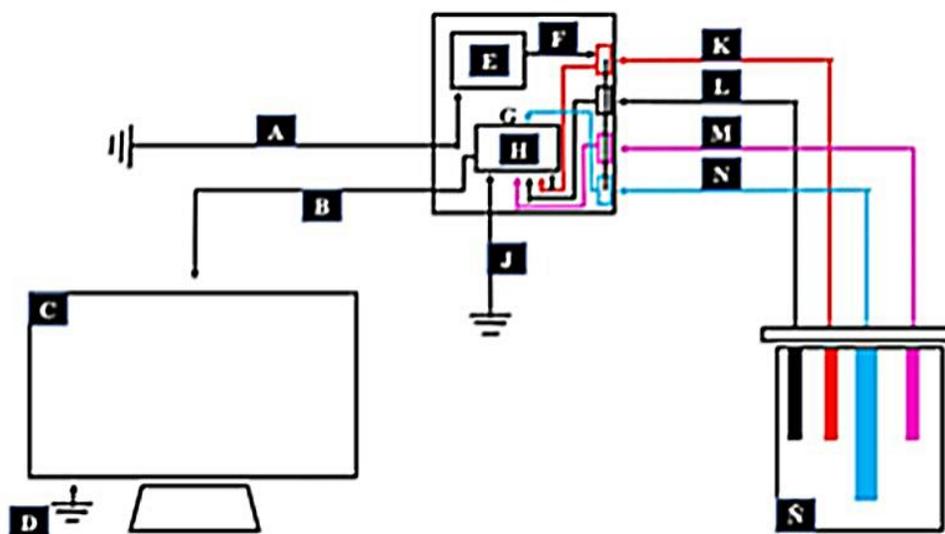


Figura 9. Diagrama de ensamblaje general de los componentes metálicos, de vidrio y eléctricos del fotobiorreactor para el crecimiento de microalgas con monitoreo en tiempo real para la optimización de los rendimientos de metabolitos primarios y secundarios.

La Figura 9 muestra que la etiqueta A es la corriente que alimenta la fuente de alimentación de 24 voltios para los sensores del fotobiorreactor. La etiqueta E indica la fuente de alimentación de 24 voltios para los sensores, esta corriente se indica en la etiqueta F, que alimenta directamente al sensor de temperatura en color rojo (K), este a su vez se conecta al sensor de pH (M) y al circuito para regulación de la intensidad luminosa (N). El sensor de oxígeno disuelto (L) funciona a 3.5 voltios y no está conectado a la fuente de alimentación, se alimenta de la tarjeta del sistema integrada (H). Los sensores de temperatura, oxígeno disuelto y pH (K, L y M) se conectan al puerto CONNECTORB/DIIO1 (I). En cuanto al regulador de luz, se conecta directamente al puerto G de la tarjeta del sistema integrado (H). La tarjeta del sistema embebido (H) es alimentada por una fuente J y las señales detectadas son enviadas (B) a la computadora (C) donde son procesadas y almacenadas para su tratamiento experimental de esta manera se instrumentó el fotobiorreactor comprobando las señales detectadas en el programa de interfaz gráfica y teniendo un registro de las señales medidas en un intervalo de 1 s para su posterior tratamiento experimental.

Como se mencionó, las señales detectadas por los distintos sensores han sido validadas y es posible comenzar con cinéticas exploratorias para microalgas.

8.1.4 Aplicación experimental bioquímica

Para comenzar con la cinética microbiana de las microalgas, es necesario preparar el medio de crecimiento acuoso 3N-BBM+V adicionado con nitrato de sodio como sustrato y esterilizarlo a 20 psi y 120 °C por un tiempo de 15 min. El medio de cultivo preparado para el fotobiorreactor se encuentra en un volumen de 7.5 L, se coloca en el vaso externo (Figura 6 letra K) y se introduce en la autoclave para su esterilización. Una vez que el medio de crecimiento está listo, los siguientes componentes se esterilizan en las mismas condiciones; recipiente interno para la fuente de luz LED azul (Figura 6 letra H), tornillos para sujetar los sensores de pH y oxígeno disuelto (Figura 6 letra B), tapa de acero inoxidable (Figura 6 letra M), difusor de acero inoxidable (Figura 6 letra A), tapas de tornillos de acero inoxidable para los sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto (Figura 6 letra C), mangueras para difusión y muestreo de CO₂, filtro de CO₂, tornillos metálicos. Por otro lado, con el uso de una campana de flujo laminar y luz ultravioleta se esterilizan los componentes del fotobiorreactor que son sensibles a la temperatura; sensor de pH, oxígeno disuelto, sensor de temperatura con clip Figura 6 letras B, D y E) y sellos plásticos para las tapas de los sensores de acero inoxidable y fuente de luz LED azul (Figura 6 letra G).

Una vez que el material estéril está listo, cada uno de los componentes se colocó en la campana de flujo laminar con luz ultravioleta de la siguiente manera:

1. El vaso exterior se colocó sobre el soporte de acero inoxidable a 4 postres para seguir añadiendo los 7.5 L de medio.
2. Se introdujo el difusor de acero inoxidable al que se debe conectar por la parte superior una manguera de látex y el filtro de CO₂.
3. Los sujetadores de acero inoxidable para los sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto están unidos a la tapa de acero inoxidable. Con la ayuda de cubiertas de acero inoxidable para estos tres sensores y tornillos se fijan a la cubierta.

4. Bajo presión se colocaron los sensores de pH y temperatura. En el caso del sensor de temperatura, no es necesario ya que ya viene fijado al sujetador de acero inoxidable.
5. Las mangueras de látex para muestreo y para inyección de CO₂ se colocaron en los pequeños orificios.
6. La tapa se colocó en el recipiente exterior.
7. Por el orificio central se introdujo el preinoculo con microalgas para que comience el crecimiento.
8. El tubo interno para la fuente de luz LED azul se colocó y sujetó con la ayuda de la tapa y los tornillos de acero inoxidable.
9. Finalmente, se colocó la fuente de luz LED y se retiró la campana de flujo laminar para conectar los sensores al gabinete electrónico e iniciar el programa de monitoreo de la cinética microbiana.

Para comenzar a monitorear una vez que la computadora esté encendida, se hace clic en el ícono del programa LabVIEW y selecciona el proyecto titulado "Fotobiorreactor". A continuación, se conecta la tarjeta de adquisición de datos a la computadora y se encienden los sensores a través de la fuente de alimentación de 24 voltios. Una vez detectada la tarjeta por el ordenador, se abre la interfaz diseñada en la que se registra en tiempo real el comportamiento del pH del medio, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto (expresado en % y en mg/L). Esta interfaz permite ajustar la intensidad de la luz LED azul en un rango de 0 a 1100 lúmenes y además cuenta con una salida de datos en forma de tabla donde se concentran los datos adquiridos en tiempo real en un intervalo de tiempo por segundo (s). Tan pronto como se detiene el programa con el botón "STOP", se abre automáticamente un documento con extensión ".xlsx" donde se concentran todos los datos adquiridos y, por lo tanto, se guardan, analizan o exportan.

Una vez finalizada la cinética microbiana, se cierra el programa "LabVIEW", se desconecta la tarjeta de adquisición de datos del puerto USB de la computadora, se enciende la fuente de alimentación de los sensores.

El fotobiorreactor instalado y listo para el crecimiento de microalgas tiene un aspecto como el de la siguiente Figura 10.

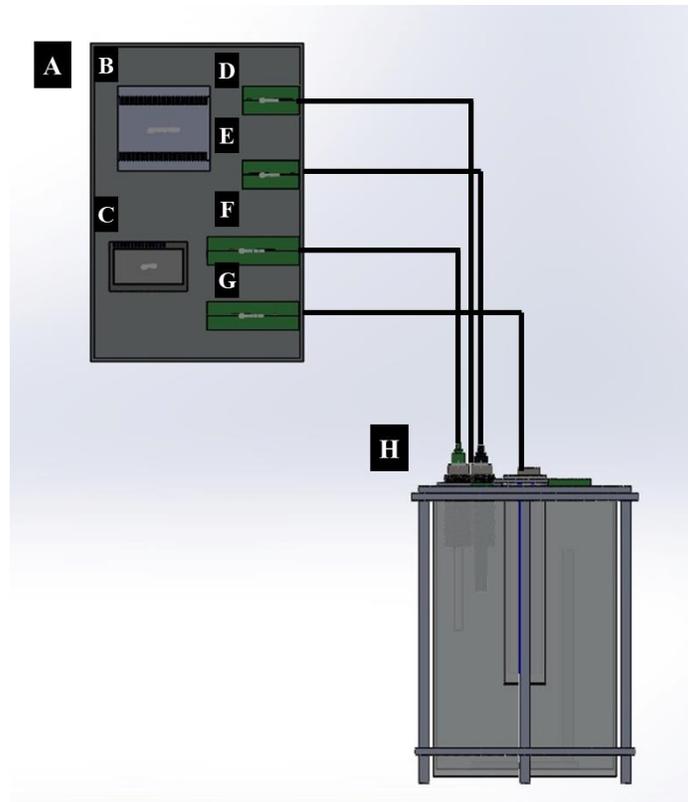


Figura 10. Aspecto final del fotobiorreactor. (A) Gabinete con componentes electrónicos. (B) Fuente de alimentación de 24 voltios. (C) Tarjeta de adquisición de datos. (D) Arreglo electrónico para sensor de temperatura. (E) Arreglo electrónico para sensor de oxígeno disuelto. (F) Arreglo electrónico para sensor de pH. (G) Disposición electrónica para la regulación de la intensidad de la luz. (H) Fotobiorreactor montado con sensores de monitoreo en tiempo real y fuente de luz LED azul.

8.1.5 Calibración

Temperatura

El primero de los sensores a calibrar fue el termopar (sensor de temperatura) para lo cual se obtuvo una solución estándar de agua destilada, la cual con ayuda de baños de hielo y calentamiento sobre rejilla magnética se realizaron variaciones de temperatura. Las variaciones de temperatura se realizaron en un rango de 0 a 90 °C, el límite superior se debió a que a partir de esta temperatura el agua comenzó a hervir. Los incrementos fueron graduales ± 2 °C. Las pruebas se realizaron por triplicado y las respuestas detectadas en la variación del voltaje se presentan en la siguiente Figura 11.

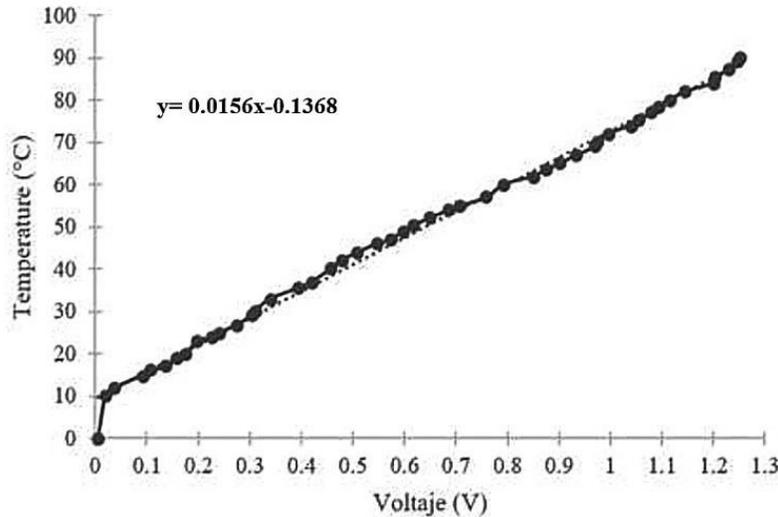


Figura 11. Curva de calibración de sensor de temperatura en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. $n=3$, $\alpha=0,05$.

Como se puede observar en la Figura 11, los datos tienen un comportamiento lineal e incluso la variación entre cada uno de los muestreos es estadísticamente similar ya que las desviaciones estándar son muy cercanas a las medias de cada dato. Al calcular el valor de r^2 para la *correlación de Pearson* fue de 0.994, por lo que la señal es detectada y traducida tanto por la tarjeta, como en el programa gráfico, por lo que la medición es confiable. Con la ecuación obtenida se logró estimar y monitorear la temperatura ya que el termopar fue sometido a solución de problemas de agua destilada y en todos los experimentos se logró tener una medición correcta en tiempo real.

Oxígeno disuelto (O_2)

Para la calibración del sensor de oxígeno disuelto se utilizan muestras de agua destilada donde se sabe que el agua alcanza naturalmente una saturación del 20% de oxígeno en el medio (Silva & Palma, 2006) y que, al ser sometida a altas temperaturas sin llegar a evaporarse, se elimina el oxígeno disuelto, por lo que la concentración sería igual al 0%. Este porcentaje se refiere al oxígeno disponible en el agua cuando se disuelve, no implica los átomos que componen la molécula de agua (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005). Por otro lado, a medida que el agua pasa por un proceso de agitación, se le va incorporando oxígeno al agua hasta llegar a la saturación, es decir, al 100%. Para saber cuál sería la saturación de oxígeno, las muestras se sometieron a agitación bajo una parrilla eléctrica con agitador magnético, con lo cual se informó el cambio de voltaje a medida que pasaba el tiempo de agitación y se detenía hasta que el electrodo no presentaba cambios significativos, con lo cual se supuso que ya se había alcanzado la saturación de oxígeno en el medio. Los intervalos de tiempo para tomar la muestra de voltaje a medida que se agitaba el agua destilada fueron cada minuto. Los datos obtenidos tuvieron un comportamiento como los de la siguiente Figura 12;

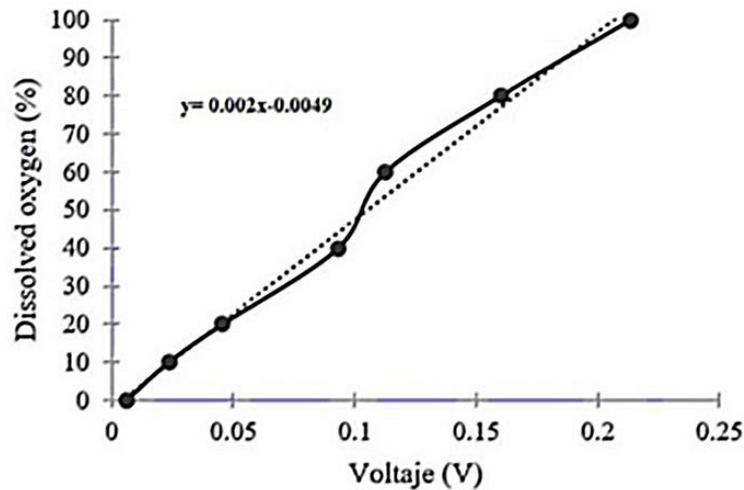


Figura 12. Curva de calibración de sensor de oxígeno disuelto (O_2) en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. $n=3$, $\alpha=0,05$.

El coeficiente de *regresión de Pearson* tuvo un valor de r^2 de 0.985, con lo cual se pueden realizar buenas estimaciones en muestras de concentración desconocida. De manera similar, con la ecuación de la Figura 12 generada, se continuó colocando en el programa gráfico dentro del algoritmo y se obtuvieron las medidas correctas al leer las muestras del problema.

pH

El sensor de pH, en el cual se construyó una serie de diluciones a través de soluciones buffer estándar marca SIGMA donde se varió el pH en incrementos de 0.5 partiendo desde una solución buffer de 1 hasta un rango mayor de 11.5. La razón de no trabajar con una escala de 1 a 14 para la curva de calibración de pH fue porque la experimentación en el crecimiento de microalgas, y específicamente de un modelo biológico de *C. vulgaris*, el pH óptimo para el crecimiento es 10 por lo que no es necesario preparar buffers alcalinos arriba de 12, ya que no son necesarios e implica un gasto adicional para el proceso operativo debido a que en la curva se utilizaron buffers marca Golden-Bell. A continuación, se muestra la referencia que se agregó al trabajo donde se indica el pH óptimo de la microalga. Los diferentes tampones a los que debían prepararse se realizaron utilizando tampón de fosfato monobásico y etilamina. Los voltajes registrados en el sensor conectado a la tarjeta de adquisición de datos fueron los siguientes en la Figura 13:

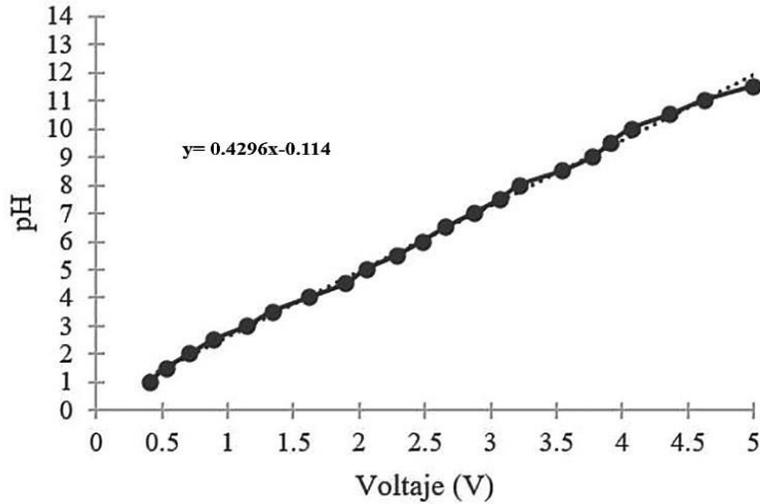


Figura 13. Curva de calibración de sensor de pH en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. $n=3$, $\alpha=0,05$.

Mediante una regresión lineal y con la estimación del valor r^2 en la *correlación de Pearson* se obtuvo un valor de 0.998, con lo cual se indica que el voltaje detectado tiene relación directa con el tipo de solución a un pH determinado y por lo tanto se puede estimar el pH de alguna solución de pH desconocido.

De esta manera, el pH de las soluciones desconocidas, así como tampones estándar de laboratorio, podría medirse correctamente en tiempo real a través del programa de interfaz gráfica.

Intensidad de luz

La intensidad de la luz a la que se va a trabajar la cinética de crecimiento de las microalgas la determina el usuario, la medición de los Luxes emitidos por la fuente de luz LED azul se realizó a través de un Medidor de Luz Digital de la marca MASTECH (MS6612) para lo cual se tomaron medidas en cuatro puntos de la fuente de luz; delantero, lateral derecho, lateral izquierdo y trasero. Se tomaron medidas en un punto alto y bajo de cada una de las tiras de luz LED y las medidas se hicieron con variaciones del ciclo de trabajo de ± 0.05 trabajando en un rango de 0 a 1 ciclo de trabajo. Los resultados de la curva de calibración a través de la medición del modo se presentan en la Figura 14.

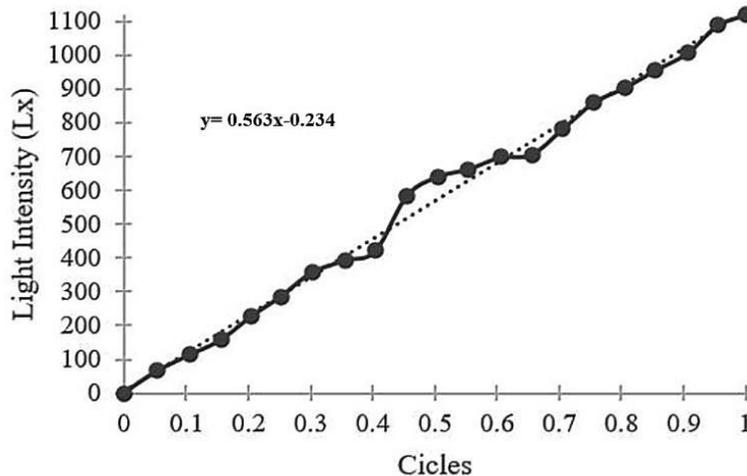


Figura 14. Curva de calibración de intensidad de luz en fotobiorreactor para crecimiento de microalgas monitoreado en tiempo real. $n=3$, $\alpha=0,05$.

La calibración se realizó offline debido a que para aislar la fuente de luz de cualquier emisión externa se construyó un cilindro de plástico con el cual se realizaron diferentes mediciones como se menciona en el apartado de materiales y métodos; sin embargo, una vez operando el reactor online se debe medir la intensidad donde no se tendrán variaciones a menos que, a través del software del equipo, se indiquen las condiciones de trabajo.

Como se puede observar, el valor de r^2 en la *correlación de Pearson* fue de 0.998, lo que permite que se pueda programar el programa gráfico para que el usuario configure los Luxes de trabajo y el programa realice ajustes a los ciclos de trabajo correspondientes.

De esta forma se instrumentó el fotobiorreactor comprobando las señales detectadas en el programa de interfaz gráfica y teniendo un registro de las señales medidas con un intervalo de 1 s para su posterior tratamiento experimental.

Dentro del análisis previo que se ha realizado sobre la construcción del fotobiorreactor, se pueden mencionar diferentes trabajos en los que no se ha encontrado ningún invento similar al propuesto en este trabajo. Para ello se realizaron búsquedas en la base de datos de obras en busca de patentes o que hayan sido registradas como patentes. Los inventos son los siguientes:

“Dispositivo de iluminación para biorreactores”, con el que, debido a que se consigue una distribución de luz muy homogénea de alta intensidad en el fotobiorreactor cilíndrico mediante diodos emisores de luz SMD (tecnología de dispositivos de superficie), con los que el portador es directamente montado, que está diseñado como una placa de circuito impreso. El montaje directo junto con el diseño compacto de los LED SMD permite un montaje muy denso, preferentemente superior al 30%, de forma especialmente preferente superior al 60%, cuando se utilizan placas multicapa incluso hasta un 75% de cobertura de la superficie del soporte. con LED. Por ejemplo, se pueden usar LED de color blanco cálido con un espectro similar a la luz solar, posiblemente en combinación con LED de colores o LED que emiten

en el rango UV. Mediante el uso combinado y el control asistido por ordenador de LED monocromáticos y de espectro blanco similar a la luz solar, se pueden generar diferentes intensidades y espectros de luz. Con el dispositivo de iluminación externo en las paredes transparentes del reactor, se puede lograr una distribución de luz casi homogénea dentro del reactor (también) radialmente.

Por otro lado, el trabajo el registrado por Aramanco services CO, propone una invención referente a un fotobiorreactor con diodos emisores de luz (LED) pulsantes para la fotofijación rentable de dióxido de carbono (CO₂). Preferiblemente, los LED emiten luz de foco estrecho a una longitud de onda de 660 nm para optimizar el secuestro de dióxido de carbono mientras se minimizan los costos de energía y aumenta la fotosíntesis de algas (Aramanco services CO, 2021). Además, también se puede mencionar el trabajo titulado “Fotobiorreactor multicapa tipo cilindro”, donde se propone un multifotobiorreactor cilíndrico para el cultivo masivo de microalgas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un fotobiorreactor para el cultivo masivo de microalgas que utiliza una fuente de luz en forma de placa o circular que consiste en un diodo emisor de luz (LED), un diodo emisor de luz orgánico (OLED) y una fuente de luz flexible. -diodo emisor (LED), que son delgados para minimizar el volumen y altamente eficientes energéticamente (Inha Ind Partnershio inst., 2021).

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un fotobiorreactor cilíndrico que sea más delgado que una fuente de luz como una lámpara LED esférica o una lámpara fluorescente, que tenga una alta productividad por volumen y que pueda satisfacer varias condiciones de aplicación. La fuente de luz cilíndrica está hecha de un LED flexible (diodo emisor de luz flexible). Es preferible que la forma exterior de la cámara de reacción sea cilíndrica. Además, la fuente de luz cilíndrica se puede apilar una o más en la cámara de reacción. Si bien la invención no ha sido comparada en su totalidad con otros trabajos existentes en cuanto a la producción de biomasa o de algunos otros metabolitos, lo cierto es que reuniendo todas las condiciones para un crecimiento óptimo en el equipo y colocando los sensores en los lugares indicados brindan un correcto seguimiento de las condiciones de crecimiento y logra que existan altos niveles de producción ya que las condiciones de trabajo mixotróficas que es la condición óptima de crecimiento que sumado a la morfología del equipo ayudará en ello. Previo a este trabajo se ha realizado un trabajo a nivel de matraz en nuestro equipo de trabajo donde el medio de cultivo es heterótrofo y se ha observado que con las condiciones trabajadas se han encontrado rendimientos significativos en comparación con los existentes actualmente, por lo que se espera que, al pasar de una experimentación a nivel de matraz a un nivel de fotobiorreactor con la construcción, los niveles de respuestas aumenten y por lo tanto sean competitivos.

De la misma manera, se tiene un fotobiorreactor para la producción en masa de microalgas utilizando fuente de luz en forma de placa de alta eficiencia energética donde la invención es un fotobiorreactor para la producción en masa de microalgas, en el cual LED (light emitting diode), OLED (organic light diodo emisor) y el LED flexible está equipado en un sustrato para transmitir la luz de manera eficiente y permitir el cambio de la fuente de luz. Además, podemos hablar de un fotobiorreactor con deflectores provistos integralmente de fuente de luz interna para el cultivo de microalgas en alta densidad” (registro KR101043583B1) donde la invención se relaciona con un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas en alta

concentración, y más particularmente, para un fotobiorreactor para mejorar la eficiencia de agitación de una fuente de luz interna hecha de un LED (diodo emisor de luz) para mejorar la eficiencia de utilización de la luz y la biomasa de gas y microalgas la presente invención se refiere a un fotobiorreactor en el que se forma integralmente un deflector para maximizar eficiencia del cultivo microbiano.

Por último, se puede hacer referencia al trabajo realizado por Honda *et al*, que desarrolló un fotobiorreactor de alta eficiencia para microalgas bajo un sistema de intercambio de gases para una central térmica y donde se compara este equipo con uno abierto. tanques al aire libre. La innovación del equipo diseñado es que cuenta con una fuente de luz artificial central que busca tener un mayor rendimiento en el crecimiento de microalgas, así como poder regular y ajustar la concentración de CO₂ para intercambiar este gas con O₂ para realizar un metabolismo mixotrófico. La fuente de luz artificial fue fibra óptica, generando un equipo eficiente y económico; sin embargo, se menciona que las dimensiones del equipo son pequeñas. La intensidad de la luz aplicada fue de 1000 lux y como resultado se concluyó que se logró el intercambio de gases CO₂ y O₂ en el proceso de crecimiento de la microalga *Chlorella pyrenoida*, generando un gasto 100 veces mayor que los cultivos al aire libre, por lo que se puede ser un proceso que implique un gasto energético pero que logre un crecimiento adecuado de las microalgas. Con base en esto, se reafirma que el diseño del equipo descrito en este trabajo presenta características que pueden brindar un crecimiento adecuado y con resultados positivos significativos para el crecimiento de las microalgas ya que, por mencionar algunas características, el equipo también cuenta con una alimentación de CO₂ para el crecimiento mixotrófico y trabajando bajo una intensidad de luz recomendada como se describe en el trabajo ya que el fotobiorreactor diseñado para este trabajo va de 0 a 1120 lux (Honda, 2019).

Como se puede apreciar con los antecedentes encontrados, la disposición y tipo de sensores para el diseño del fotobiorreactor en este trabajo es alentador para su uso a nivel industrial y no existe nada similar que permitiera la recién otorgada IP en el " categoría de modelo de utilidad".

8. 2 Cinéticas microbianas a nivel matraz

Como primera parte del trabajo doctoral se llevó a cabo el diseño y aplicación de un diseño de experimentos de cribado a dos factores con dos puntos centrales, en donde se evaluaron: el tipo de sustrato, concentración de sustrato y tipo de fotoperiodo (tiempo de exposición a la luz). Como sustratos se utilizaron acetato de sodio y glicerol. En cuanto a las concentraciones trabajadas se tomaron, para acetato de sodio 0.0005 g/L, 0.0010 g/L y 0.0015 g/L. Para glicerol se trabajó a 0.27 g/L, 0.33 g/L y 0.44 g/L. Los tipos de fotoperiodos fueron dos: el primero corto a 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad (8:16) y el segundo inverso, es decir, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El total de corridas experimentales fueron de 8 para cada sustrato, haciendo un total de 16 y en donde cada experimentación fue realizada por triplicado de manera aleatoria en una sola fase o desarrollo de experimentos, un solo bloque.

Lo primero que se presenta para análisis el crecimiento celular, el cual está representado por la cantidad de células nuevas formadas a lo largo de las cinéticas microbianas. Las cinéticas, como se mencionó anteriormente, se iniciaron bajo una concentración celular de 50×10^6 células/mL y de allí se comenzó con el conteo bajo microscopio en la cámara de Neubauer. El comportamiento se presenta en la siguiente Figura 15.

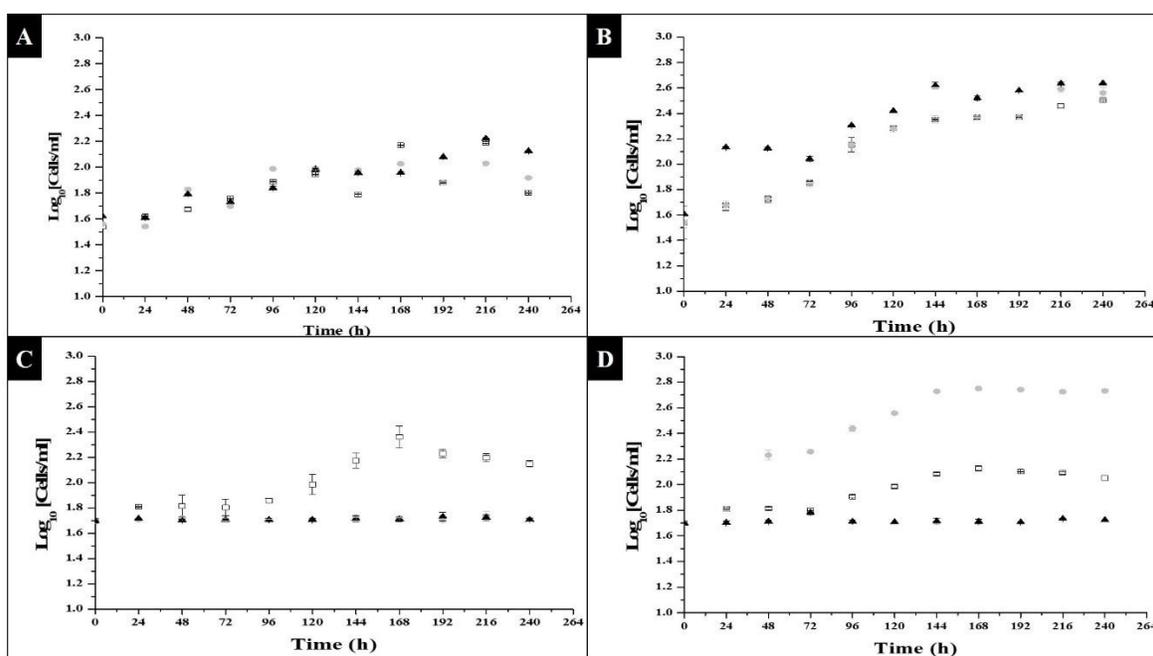


Figura 15. Crecimiento celular de *C. vulgaris* en medio fotoheterotrófico: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □, 0.0005 g/L, ●, 0.001 g/L y ▲, 0.0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □, 0.27 g/L, ●, 0.33 g/L y ▲, 0.44 g/L de concentración de glicerol.

Con base en la Figura 15, se puede observar claramente que bajo la condición de acetato de sodio, y bajo las tres condiciones de concentración, hubo un incremento en el número de células iniciales llegando a la fase exponencial alrededor de la hora 96, entrando a la fase estacionaria alrededor de la hora 144, y tomando un tiempo de adaptación de alrededor de 72 h, por lo que se puede decir que esta condición de crecimiento permitió a *C. vulgaris* activar su metabolismo luego de un período de 3 días. Comparando el fotoperíodo con acetato de sodio bajo 8 h de luz, con respecto a las tres condiciones de concentración de sustrato, el mayor valor de Log10 se obtuvo en la hora 168, siendo 2.16, 2.02 y 1.96 para las concentraciones de 0.0005, 0.001 y 0.0015 g/L, respectivamente; luego de realizar una prueba de ANOVA de una vía, se encontró que, en este momento, hubo diferencias significativas, y que la mejor condición fue bajo una concentración de 0.0005 g/L. El valor de r^2 fue 0.998. Para el fotoperíodo de 16 h de luz al mismo tiempo, 168 fue donde se encontró el mayor valor de Log10, siendo de 2.37, 2.37 y 2.52 para la concentración de 0.0005, 0.001 y 0.0015 g/L, respectivamente. Las dos primeras condiciones; sin embargo, fueron estadísticamente iguales, siendo diferente solo la concentración más alta. El valor de r^2 para este ANOVA unidireccional fue 0,999. Por lo tanto, se puede decir que, para este fotoperíodo, hubo un efecto igualmente positivo para las condiciones más bajas y medias en la concentración de sustrato, pero para una concentración más alta de sustrato, hubo una inhibición del crecimiento celular.

Finalmente, para analizar si el tipo de fotoperíodo influía en el crecimiento celular, se tuvieron en cuenta los puntos de máximo crecimiento celular en el mismo tiempo de crecimiento (168 h), y se observó que, estadísticamente, las condiciones eran diferentes, excepto por la condición de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a una concentración de sustrato de 0,0005 y 0,001 g/L de acetato de sodio; sin embargo, estas fueron las condiciones con mayor crecimiento celular, por lo que se puede decir que el tipo de fotoperíodo influyó en el crecimiento celular y que las que tuvieron una mayor prolongación en el tiempo favorecieron el crecimiento celular en *C. vulgaris*. El valor $Prob > F$ fue < 0.0001 , con un valor ANOVA r^2 de 0,999. La explicación de que el comportamiento sea constante o lento en la hora 144 se debió a que si ya hubo una disminución en el consumo de sustrato, como se verá en la figura 17A; el comportamiento coincidió con la disposición del sustrato diluido: cuando menos estaba disponible para la microalga, su crecimiento exponencial dejó de aumentar, y ni siquiera hubo una fase exponencial marcada, como se observa en la Figura 15(B). De la misma manera, esto se aplicaba al efecto del fotoperíodo, ya que era un factor inductor de la actividad metabólica para el crecimiento celular. En el caso de la concentración de 0.0005 g/L, a la hora 144 la disponibilidad de sustrato fue mínima, como se verá en la Figura 17(A); este valor bajo puede deberse a la falta de consumo de acetato de sodio y, por lo tanto, no se promovió el crecimiento.

En cuanto a la condición de glicerol, solo bajo la condición de 0.27 g/L después de un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad hubo un crecimiento significativo, comenzando el paso exponencial a la hora 96 y alcanzando la fase estacionaria a la hora 168. En cuanto al fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, hubo crecimiento tanto en las condiciones de 0.27 como de 0.33 g/L, comenzando la fase exponencial en la hora 72, y alcanzando el máximo crecimiento celular en la hora 168, cuando se observó la fase estacionaria, por lo que se puede decir que la saturación del medio con glicerol a 0.44 g/L inhibió el crecimiento celular. En cuanto al análisis comparativo, mediante el ANOVA de una vía y el análisis *HSD*

de Tukey-Kramer, el valor de r^2 para el ANOVA fue de 0.994 con un valor de $Prob > F < 0.0001$, por lo que hubo diferencias significativas. Con el análisis HDS de Tukey-Kramer se pudo identificar que el glicerol se encuentra en una concentración de 0.33 y 0.44 g/L después de un fotoperíodo corto (8 h de luz), y la condición de 0.44 g/L después de un fotoperíodo largo (16 h de luz), no fueron significativamente diferentes, ya que no hubo división celular. La condición que favoreció el crecimiento; sin embargo, fue la de 0.33 g/L de glicerol en fotoperíodos prolongados. Además, el resto de las condiciones experimentales fueron estadísticamente diferentes; por lo tanto, el tipo de fotoperíodo, así como la concentración y el tipo de sustrato son relevantes para el crecimiento de *C. vulgaris*.

En este estudio, buscábamos un aumento en la cantidad de nuevas células formadas, ya que este era un estudio destinado a servir como base en la cinética de crecimiento a nivel del fotobiorreactor; de esta forma, a mayor número de células, se podrá tener una mayor concentración de metabolitos sintetizados, si se encuentran los factores que promuevan dicha síntesis, ya que puede haber células grandes (biomasa), pero no necesariamente tienen una mayor síntesis de pigmentos. Lo anterior se desprende de lo observado en un estudio de Kong et al. a partir del año 2020, en el que hubo un aumento en la cantidad de biomasa generada, pero disminuciones significativas en la cantidad de pigmentos en *C. vulgaris* (El-Sheekh et al., 2019).

Para la cinética se decidió iniciar con una concentración de 50×10^6 células/mL, ya que la cinética se inició con concentraciones de 10×10^6 células/mL, 20×10^6 células/mL y 30×10^6 células/mL en estudios exploratorios previos, pero al momento del muestreo, no se obtuvo una cantidad significativa observado había un número considerable de células en la cámara de Neubauer, por lo que las tomas de muestras de exploración indicaron una concentración más baja que las iniciales, y había demasiada variación en el recuento de células. Con una concentración de 50×10^6 células/mL, este recuento se observó mejor. Las Figuras 15(B), (D) muestran el comportamiento en las fases cinéticas, ya que se observó el efecto del fotoperíodo. Creemos; sin embargo, que el número de células no fue mayor porque el sustrato inorgánico era limitante, y esto se reafirmó como se muestra en la Figura 17. Para este estudio se buscaron condiciones de optimización, es decir, una cantidad baja de sustrato, pero suficiente para promover el crecimiento celular, así como promover la síntesis de metabolitos debido a la condición de estrés.

Para el segundo parámetro a analizar se presenta el comportamiento de la biomasa en la siguiente Figura 16.

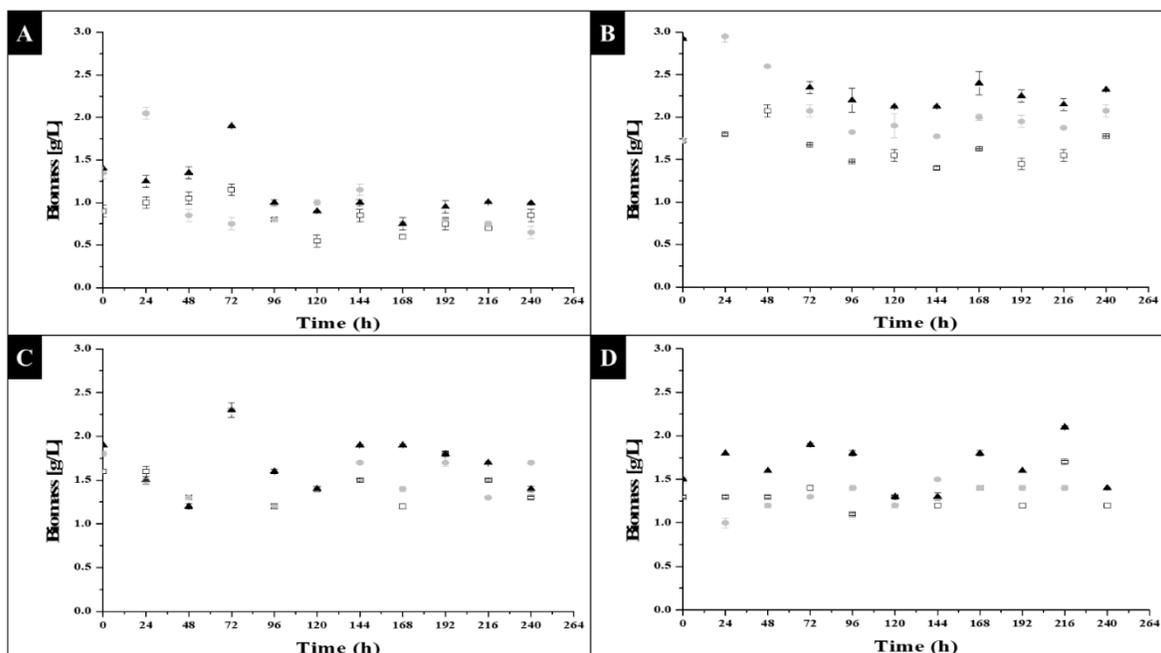


Figura 16. Biomasa de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □0,0005 g/L, ●0,001 g/L y ▲0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □0.27 g/L, ●0.33 g/L y ▲0.44 g/L de concentración de glicerol.

Las Figuras 16(A), (B) muestran que se observó una disminución de la biomasa con respecto a la biomasa inicial, lo que puede deberse a que, si se compara con la Figura 15, se presentó un crecimiento celular, pero no un crecimiento o agrandamiento de las células individualmente; por lo tanto, bajo la técnica de peso seco, no se permitió una alta sensibilidad donde se detectaron por su peso las pequeñas y numerosas células nuevas formadas. Adicional a esto, se observó que, durante los días de cinética, el medio se tornaba verde, y había tramos donde se presentaba un agrupamiento de células en forma de racimos, por lo que, al momento de tomar la muestra para peso seco, no hubo un muestreo uniforme de material celular, a pesar de que el crecimiento se produjo bajo agitación. Con los datos obtenidos; sin embargo, fue posible calcular la cantidad de biomasa en el matraz y el grado en que se podría concentrar para formular y producir productos biotecnológicos, como se puede ver en la Figura 15 la formación de células.

Teniendo en cuenta la biomasa después de la fase exponencial de la Figura 15, se encontró que la mayor concentración se alcanzó en el acetato de sodio después de las 8 h de luz, en la hora 144, cercana a la hora en que se inició la fase estacionaria, y donde hubo una concentración máxima de 0.85, 1.15 y 1.03 g/L para la concentración de 0.0005, 0.001 y 0.0015 g/L de sustrato, respectivamente. Para el acetato de sodio a las 16 h de luz, la concentración máxima se alcanzó en la hora 168, siendo 1.63, 2.03 y 2.4 g/L para la concentración de 0.0005, 0,001 y 0,0015 g/L de sustrato, respectivamente. Con estos datos se realizó un análisis ANOVA de una vía, el cual tuvo un r^2 de 0.991, indicando diferencias significativas entre las condiciones evaluadas; con la prueba *Tukey-Kramer HSD* se

observaron diferencias significativas, en que el acetato de sodio a un fotoperíodo de 16 h de luz logró la máxima concentración, y con lo cual se puede apreciar que el tipo de fotoperíodo y el tipo de sustrato tuvieron mayor efecto que la concentración del sustrato. A pesar de ello, se encontró una concentración máxima de biomasa a la hora 24, tras un fotoperíodo de 16 h de luz, que fue de 3.825 g/L, por lo que sería interesante ver si en este momento se pueden variar nuevos parámetros que permitan aumento de este valor o para mantenerlo a lo largo de la cinética experimental microbiana con diseños experimentales más robustos.

En cuanto al comportamiento de la biomasa para glicerol en la Figura 16(C),(D), se puede observar que no existió una línea ascendente en la cantidad de biomasa, tanto para el fotoperíodo de 16 h de luz, como para el fotoperíodo de 8 h de luz, como en ambos casos los valores oscilaron entre una concentración de 1.2 g/L a 2.3 g/L; una prueba de *Tukey-Kramer HSD* indicó que no hubo diferencias significativas, por lo que en el glicerol no tuvo efecto el tipo de concentración de sustrato, ni el tipo de fotoperíodo.

El consumo de sustrato dentro de la cinética de crecimiento se comportó de manera inversa a la generación de nuevas células, biomasa y productos; La Figura 17 muestra el comportamiento observado:

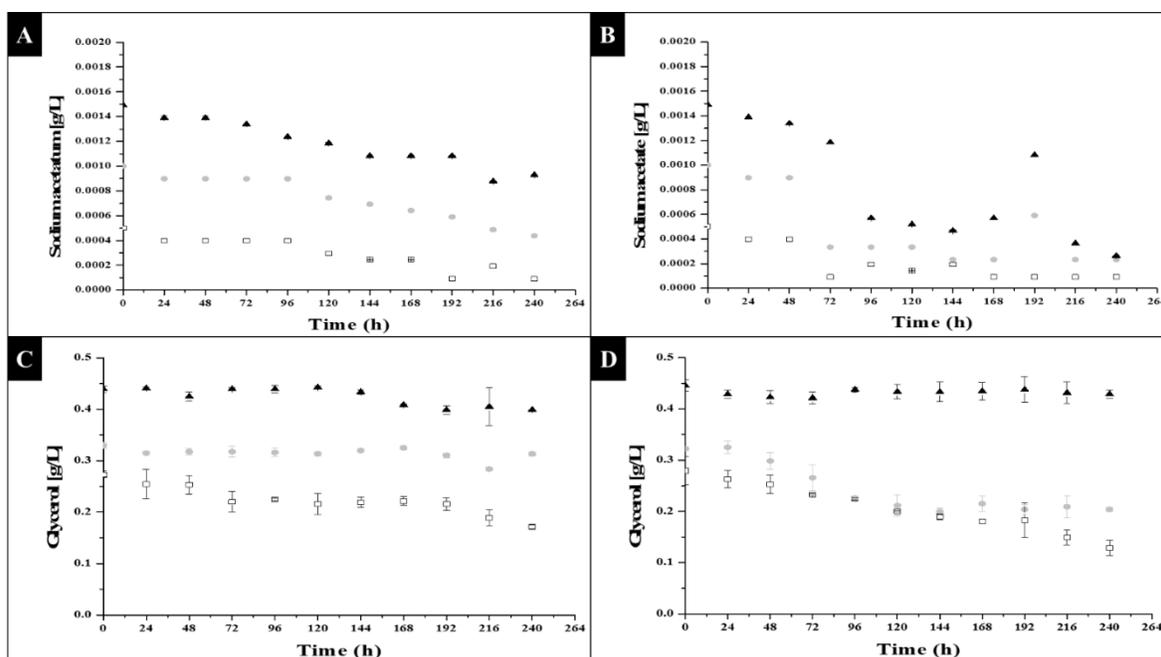


Figura 17. Consumo de sustrato de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □, 0,0005 g/L, ●, 0,001 g/L y ▲, 0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □, 0.27 g/L, ●, 0.33 g/L y ▲, 0.44 g/L de concentración de glicerol.

Como se muestra en la Figura 17(A), (B), hubo un consumo significativo en las diferentes concentraciones de sustrato. En la Figura 17(B) se puede apreciar una mayor disminución. Este comportamiento estuvo de acuerdo con lo observado en la Figura 15(B), que fue la condición experimental con mayor formación de células. En la Figura 17(A), la disminución fue menos pronunciada, así como los aumentos menores en las celdas de la Figura 15(A). Con base en estas observaciones concluimos que el sustrato utilizado estaba siendo consumido por las microalgas, para activar su metabolismo y promover su división celular; cuando el acetato de sodio comenzó a agotarse o limitarse fue cuando la microalga entró en su estado estacionario. Con respecto al consumo de glicerol, se puede observar en la Figura 17(C), 17(D), que fue solo en la condición de fotoperíodo prolongado, Figura 17(D), que ocurrió una disminución en la concentración de glicerol, y que este mismo comportamiento se invirtió, en cuanto al número de células formadas, en la Figura 15(D). En cuanto a la Figura 17(C) (fotoperíodo corto), se puede observar que en las condiciones de glicerol de 0.001 y 0.0015 g/L, las disminuciones fueron mínimas, ya que no hubo condiciones que favorecieran la inducción de actividad metabólica en las microalgas, como se muestra en la Figura 15(C), e iniciar el consumo de sustrato, de manera que el glicerol se mantuvo constante o tuvo ligeras variaciones de concentración a lo largo de la cinética. Con lo anterior, se reafirmó el hecho de que el tipo de fotoperíodo, así como el tipo de sustrato, influía directamente en la activación metabólica para el crecimiento celular.

En cuanto a los productos formados con actividad antioxidante, a continuación, se presentan las Figuras 18 y 19. La Figura 18 muestra la actividad antioxidante evaluada por el método ABTS^{•+} y la Figura 19 muestra los resultados correspondientes a la actividad evaluada por el método DPPH[•].

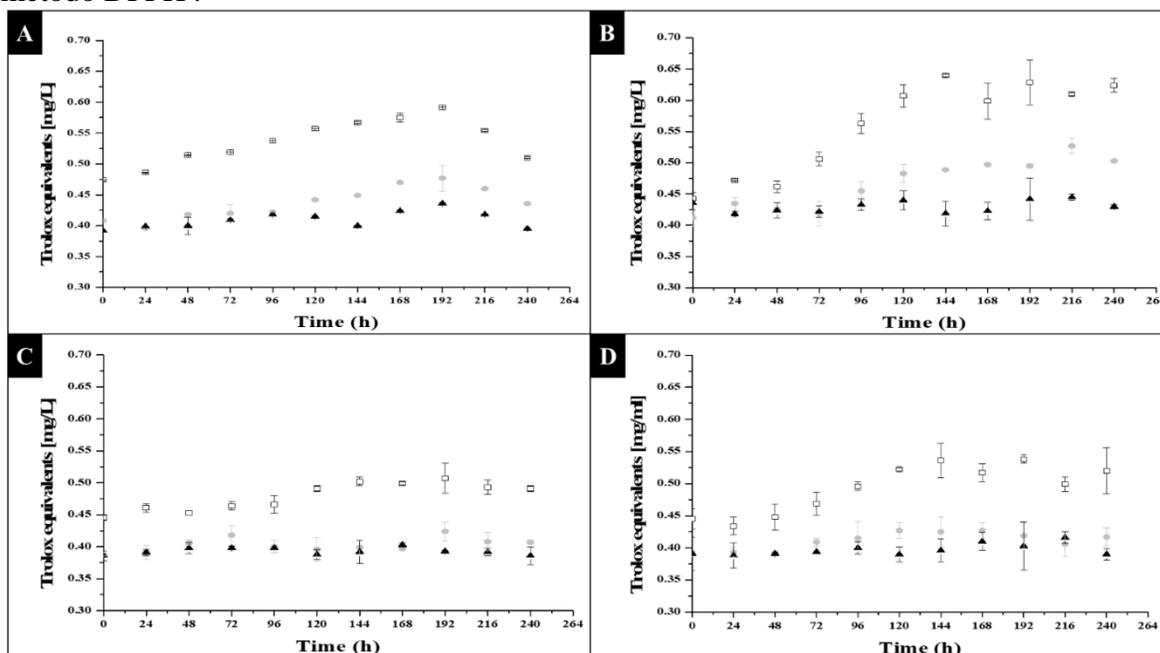


Figura 18. Actividad antioxidante de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico con el método ABTS^{•+}: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □, 0,0005 g/L, ●, 0,001 g/L y ▲ 0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □, 0.27 g/L, ●, 0.33 g/L y ▲ 0.44 g/L de concentración de glicerol.

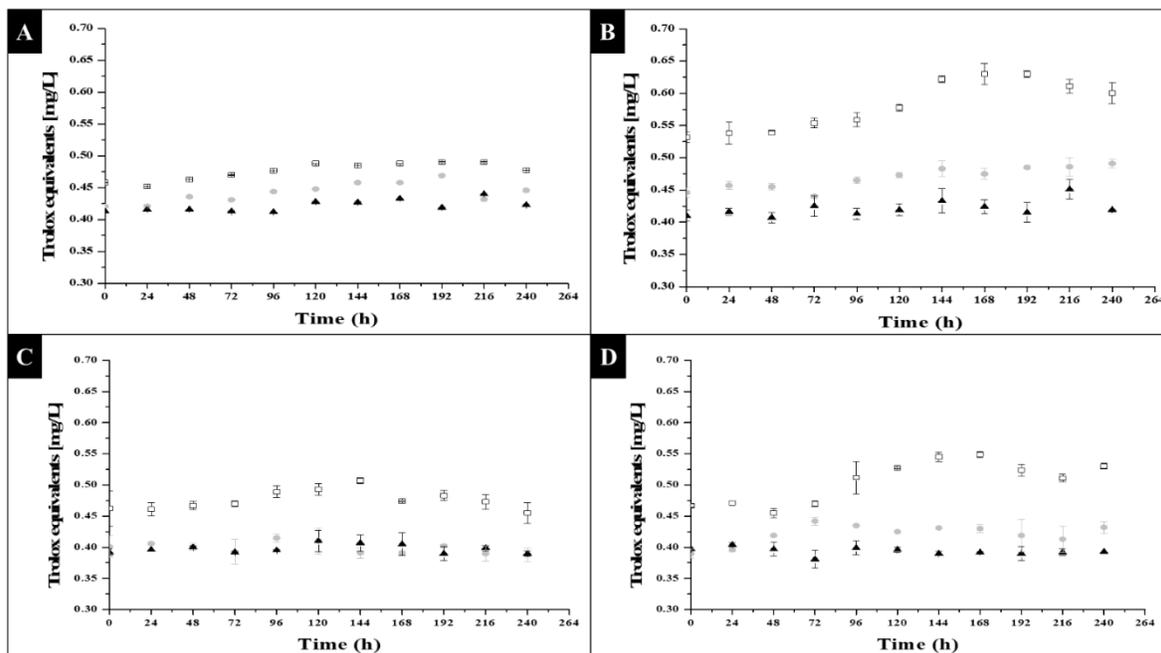


Figura 19. Actividad antioxidante de *C. vulgaris* bajo crecimiento fotoheterotrófico con método DPPH: (A) acetato de sodio en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad; (B) acetato de sodio en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. □, 0,0005 g/L, ●, 0,001 g/L y ▲, 0,0015 g/L concentración de acetato de sodio; (C) glicerol en fotoperíodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad; (D) glicerol en fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. □, 0.27 g/L, ●, 0.33 g/L y ▲, 0.44 g/L de concentración de glicerol.

La Figura 18 muestra una tendencia de comportamiento en los datos similar a la que se muestra en la Figura 15; por lo tanto, se puede suponer que, a medida que aumentó el número de células, hubo un aumento en la cantidad de metabolitos con actividad antioxidante sintetizados y almacenados. Se realizó un análisis bivariado, a través de una *correlación de Pearson*, el cual estableció que el acetato de sodio, luego de un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, tuvo un valor de r^2 de 0.46, 0.37 y 0.17 para concentraciones de acetato de sodio de 0.0005, 0.001 y 0,0015 g/L, respectivamente; por lo que se pudo ver una correlación, pero no fue lineal, lo que puede deberse a que se favoreció la síntesis de otros compuestos productos del metabolismo primario, y que esta condición experimental no provocó que las microalgas sintetizaran una gran cantidad. concentración de metabolitos secundarios con esta actividad, que protegían a la célula cuando estaba bajo estrés. Respecto a lo observado en el acetato de sodio luego de un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, se obtuvo un valor de r^2 de 0.91, 0.85 y 0.05 para la concentración 0.0005, 0.001 y 0.0015 g/L, respectivamente, lo que indicó que esta situación de estrés promovió un aumento en la cantidad de metabolitos secundarios que protegían a la célula de la exposición a la luz. La condición donde se observó una mejor correlación fue bajo una concentración de 0.0005 g/L, así como 0.001 g/L, de acetato; por lo que se puede decir que estos fueron ideales para inducir la síntesis de metabolitos con actividad antioxidante.

En cuanto al glicerol como sustrato, la *correlación de Pearson* mostró que, tras un fotoperíodo de 8 h de luz, el valor de r^2 de la relación de metabolitos secundarios, con respecto al número de células formadas, fue de 0.75, 0.05 y 0.02 para la concentración de 0.27, 0.33 y 0.44 g/L, respectivamente; por lo tanto, solo la condición de 0.27 g/L mostró una

respuesta positiva en la formación de estos metabolitos. El resto de las corridas experimentales arrojaron pocos datos, ya que no hubo crecimiento celular en esas condiciones. Por otro lado, luego de un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, se obtuvieron los siguientes valores de r^2 : 0.80, 0.15 y 0.07 para la concentración de 0.27, 0.33 y 0.44 g/L, respectivamente; por lo tanto, ocurrió algo similar a lo observado en el fotoperíodo corto; sin embargo, se puede observar que hubo mayor linealidad en la condición de 0.27 g/L de glicerol, por lo que fue ideal para favorecer la formación de estos productos cuando se utilizó glicerol como sustrato.

Finalmente, respecto a la Figura 19, las correlaciones entre la actividad antioxidante y el número de células formadas en las diferentes condiciones experimentales fueron similares a las indicadas en los párrafos anteriores; sin embargo, los resultados obtenidos entre la actividad antioxidante medida a través del método ABTS^{•+} y DPPH[•] fueron diferentes, ya que el primero midió metabolitos lipofílicos e hidrofílicos, mientras que el segundo midió solo metabolitos lipofílicos. Para la condición de acetato de sodio, luego de un fotoperíodo corto (8 horas luz), el valor de r^2 fue de 0.82, 0.59 y 0.55 para la concentración de 0.0005, 0.001 y 0.0015, respectivamente; por lo tanto, nuevamente, la condición que permitió una mejor linealidad bajo estrés fue la condición de 0.0005 g/L de acetato de sodio. En cuanto al fotoperíodo largo (16 horas luz), los valores de r^2 fueron 0.78, 0.84 y 0.03 donde hubo una mejor relación en la síntesis de metabolitos lipofílicos e hidrofílicos en acetato de sodio como sustrato a una concentración de 0.001 g/L bajo un fotoperíodo largo (16 h de luz).

El glicerol, luego de un fotoperíodo de 8 h de luz (corto) con *correlación de Pearson* tuvo un valor de r^2 de 0.12, 0.04 y 0.06; por lo tanto, no hubo correlación, bajo esta condición, en la síntesis de metabolitos lipofílicos e hidrofílicos. En cuanto al fotoperíodo de 16 h de luz (largo), el valor de r^2 fue de 0.76, 0.13 y 0.03 para las concentraciones de 0.27, 0.33 y 0.44 g/L, respectivamente; por lo tanto, solo la primera condición fue favorable e indujo una síntesis ligeramente lineal de metabolitos antioxidantes tanto lipofílicos como hidrofílicos. Teniendo en cuenta los análisis anteriores, nuestra conclusión preliminar fue que la condición donde las variables de respuesta medidas se vieron favorecidas fue la del acetato de sodio a fotoperíodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, bajo una concentración de 0.001 g/L o 0.0005 g/L.

Con los metabolitos cuantificados, el crecimiento celular y la concentración de biomasa, fue posible la caracterización cinética de *C. vulgaris* con glicerol y acetato de sodio como sustratos; se encontró que, con acetato de sodio como sustrato, *C. vulgaris* podía crecer adecuadamente en una concentración de 0.001 g/L, en un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con un tiempo de duplicación de 4,84 h (t_d) y una velocidad de división $\sigma=0.20$ h⁻¹, teniendo una concentración de biomasa al final de la cinética de 2.075 g/L a la hora 240. Respecto al glicerol como sustrato se encontró que, a una concentración de 0.33 g/L de glicerol, y tras el mismo fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), el tiempo de duplicación (t_d) fue de 4.63 h, con una tasa de división máxima de $\sigma=0.18$ h⁻¹, y con una concentración de biomasa en el final de la cinética de 1.4 g/L. Sin embargo, aunque el tiempo de duplicación fue menor que el observado con acetato de sodio como sustrato, así como la cantidad de metabolitos con actividad antioxidante, el mejor sustrato para la síntesis de estos metabolitos y para el crecimiento celular fue el acetato de sodio bajo fotoperíodos prolongados de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Finalmente, se calcularon las tasas específicas de crecimiento; el cálculo se realizó con la concentración inicial de biomasa en el día 0, y el día en que se obtuvo la máxima concentración, utilizando la siguiente Ecuación 1:

$$Td = \frac{W}{t} \quad \text{Ec 1}$$

donde W1 y W2 fueron la concentración de biomasa (g/L), y t1 y t2 fueron el tiempo en que se evaluó el cambio en la concentración de biomasa, expresado en días. Con esto, los resultados para un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con acetato de sodio como sustrato, fueron de 0.0425 g L⁻¹ día⁻¹, 0.5365 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.2682 g L⁻¹ día⁻¹. El acetato de sodio, a una concentración de 0.001 g/L, fue por tanto la mejor condición para la obtención de biomasa. En cuanto al glicerol bajo el mismo fotoperíodo, se obtuvo una tasa de 0,1823 g L⁻¹ día⁻¹ para una concentración de 0.44 g/L; para el resto de las condiciones se obtuvieron valores iguales a cero o negativos ya que, como se puede observar en la Figura 2, el comportamiento de la biomasa fue variable a lo largo de las 240 h, a pesar de que las muestras se homogeneizaron manual y eléctricamente.

Comparando con lo reportado por Li *et al.*, se pudo observar que la fase exponencial se inició en la hora 48, como se reporta en este estudio, llegando a la fase estacionaria alrededor de la hora 144, por lo que el comportamiento fue similar, lo que significó que *C. vulgaris* estaba creciendo favorablemente al usar acetato de sodio o glicerol como sustrato. Según lo informado por Li, se utilizó carbonato de sodio a una concentración de 160 mM, y las condiciones de acetato de sodio para este funcionaron adecuadamente como el glicerol (las equivalencias fueron 6.1 mM, 12.2 mM y 18.3 mM para cada sustrato); por esta razón, la presencia de iones de sodio no fue la causa de la inhibición de *C. vulgaris*, ya que no es un organismo halófilo que mantiene los iones de sodio para el mantenimiento celular (Li *et al.*, 2018). Se puede observar que la condición del acetato de sodio después de un largo fotoperíodo fue favorable para la formación de biomasa. La biomasa generada fue favorable en comparación con los resultados de un estudio de Heredia-Arroyo *et al.* 2011, en el cual, bajo crecimiento autótrofo, heterótrofo y mixotrófico a 160 rpm a 30 °C, y con glucosa como sustrato a una concentración de 4 g/L, la biomasa fue de 0.4 g/L, 0.75 g/L y 1.40 g/L, respectivamente. Los puntos máximos obtenidos en este estudio; sin embargo, fueron de 3.8 g/L para la condición de acetato de sodio a una concentración de 0,0015 g/L de sustrato a la hora 24, y a la hora 168 se obtuvo 2.4 g/L para la misma condición, seguido de por la condición de 0.44 g/L de glicerol con una concentración de biomasa de 1,8 g/L en la hora 168; ambas condiciones fueron en los fotoperíodos largos (16 h de luz y 8 h de oscuridad), por lo que estos resultados reafirmaron que el tipo de fotoperíodo tiene un efecto significativo en la biomasa generada y en la formulación del medio, la deformación y las condiciones de operación a el nivel de matraz permitiendo rendimientos superiores a los ya trabajados, por lo que escalando estas condiciones a nivel de fotobiorreactor en futuras investigaciones se podrían lograr mayores resultados; además, el uso de menos sustrato podría ahorrar recursos, en comparación con el uso de glucosa de forma convencional.

Estévez-Landazábal *et al.*, por su lado evaluaron el crecimiento de *C. vulgaris* en aguas residuales, adicionando como sustrato una condición de acetato de sodio y otra de glicerol. En el acetato de sodio se variaron las concentraciones en 5, 10 y 15 mM, resultando una

concentración máxima de biomasa de 1.96 g/L, 2.66 g/L y 3.4 g/L; en comparación, en este estudio, a concentraciones de acetato de sodio de 6.1 mM, 12.2 mM y 18.3 mM, los resultados fueron una concentración máxima de biomasa de 2 g/L, 3 g/L y 3.6 g/L; la preparación del medio tuvo un efecto significativo en la producción, en comparación con lo reportado anteriormente, ya que los nitratos de sodio estaban presentes en los componentes del agua residual, favoreciendo el crecimiento, por lo que este estudio pudo generar mejores rendimientos, ya que solo se disponía de acetato de sodio como una fuente de metabolismo (Estévez-Landazábal *et al.*, 2013).

Recientemente, en 2019, se evaluó el crecimiento de *C. vulgaris* bajo estrés, en medio fotoheterótrofo, con diferentes concentraciones de acetato de sodio (1 g/L, 2 g/L y 4 g/L), es decir, como acetato de sodio agregado con sulfato de hierro a las mismas concentraciones de acetato de 1 g/L, pero variando la concentración de sulfato de hierro a 0,5 g/L y 1 g/L. Los resultados mostraron que el acetato de sodio solo tuvo una concentración máxima de biomasa de 2.2 g/L para la condición de 1 g/L de acetato de sodio, y una concentración de 3,5 g/L en el medio con la adición de sulfato de hierro de 0.5 g /l Como se puede apreciar, los resultados fueron cercanos a los obtenidos en este estudio; sin embargo, el sustrato utilizado fue mejor, ya que en esta investigación se utilizaron concentraciones de 0.005 g/L, 0.001 g/L y 0.0015 g/L, generando ahorro de insumos, donde las condiciones operativas dieron mayores rendimientos para la aplicación tecnológica. Esta variación puede deberse al tiempo de exposición a la luz ya que, en un estudio de El-Sheekh *et al.*, no se especificó el fotoperiodo.

Como se puede observar, el tipo de fotoperiodo es un factor de gran importancia para el crecimiento de las microalgas, ya que un mayor tiempo de exposición a la radiación permite una mayor eficiencia en la fotosíntesis, y genera un mayor número de células que no son proporcionales a la biomasa sintetizada. Para apoyar lo anterior, podemos citar un estudio de Blair *et al.* 2014, donde se evaluó el tipo de luz en la cinética de crecimiento a nivel de matraz en 200 mL, 25 °C y 160 rpm de agitación, similar a la experimentada en este estudio. Blair *et al.* observaron que, de los colores de luz analizados (rojo, azul, blanco y verde), el de mejor rendimiento de biomasa fue donde se utilizó luz blanca seguida de luz azul, con una concentración de 0.04 g/L por día y 0.02 g/L por día, en comparación con lo obtenido para el acetato de sodio y el glicerol a las 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con una concentración de 0.38 g/L por día y 0.15 g/L por día; las condiciones experimentadas fueron favorables, y la luz roja tipo LED utilizada permitió la absorción de luz para optimizar la generación de biomasa. Además, las observaciones del mismo estudio sobre el comportamiento de la biomasa fueron similares a nuestro propio estudio; no hubo traza cinética exponencial, pero fue más lineal, y la división celular tuvo una respuesta similar bajo luz blanca, por lo que se comprobó que el tipo de luz tenía un efecto en la división celular, al generar células más grandes, pero que no genera la cantidad proporcional de biomasa que hubiera generado una traza similar en ambos parámetros. Por otro lado, en cuanto a la composición química de *C. vulgaris*, según el tipo de luz al que se exponga, destacamos el estudio realizado por Kula *et al.* en 2013, donde se evaluó el contenido de algunos metabolitos en luz fluorescente, siendo expuestos a luz azul y roja ya luz roja en el rango rojo lejano; esto se realizó mediante luz LED durante 10 días, y se observó que el mejor crecimiento se presentaba en luz roja y azul, y que era allí donde se favorecía la actividad metabólica. La actividad metabólica se midió a través de la emisión de energía calorífica en los cultivos asociada a los procesos de intensidad de la respiración celular. Además, se observó que las microalgas, al ser expuestas a estas

condiciones de radiación, generaban metabolitos que permitían regular el efecto de absorción de la luz, para que esta no las afectara. Estas moléculas podrían, por espectroscopía Raman, indicar terpenos, debido a la doble banda para convertirlos en moléculas cromóforas que absorbían la luz y así evitaban que dañaran otros componentes celulares. Entre estos compuestos destacamos los β -carotenos e incluso los polifenoles, de los cuales se sabía que tenían actividad antioxidante, por lo que esto demuestra que la respuesta en la estabilización de los radicales sintéticos de ABTS^{•+} y DPPH[•] se debió a la presencia de estas moléculas, ya que ambos métodos midieron la actividad de moléculas liposolubles como los carotenos (DPPH[•]) y moléculas hidrosolubles como los polifenoles (ABTS^{•+}).

Se compararon las tasas específicas de biomasa (μ) y se encontró que, en medio fotoheterótrofo con 2 y 10 g/L de sustrato, para la glucosa hubo un valor de 0.390 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.475 g L⁻¹ día⁻¹, xilosa de 0.173 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.020 g L⁻¹ día⁻¹, sacarosa 0.176 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.056 g L⁻¹ día⁻¹, maltosa 0.447 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.482 g L⁻¹ día⁻¹, acetato de sodio 0.430 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.456 g L⁻¹ día⁻¹, glicerol 0.160 g L⁻¹ día⁻¹ y 0.172 g L⁻¹ día⁻¹, los cuales fueron inferiores en algunos casos a los reportados en este estudio. La condición de acetato de sodio después de 16 h de luz, y con una concentración de 0.001 g/L de sustrato, tuvo un valor de 0.5365 g L⁻¹ día⁻¹, superior a lo informado por Kong *et al.* De igual forma, para la condición de glicerol a las 16 h de luz y con una concentración de sustrato de 0.44 g/L, el resultado fue mayor; por lo tanto, se puede concluir que las condiciones evaluadas fueron significativas para la síntesis de biomasa. Sin embargo, debido al comportamiento en la Figura 16, se recomienda un análisis más sólido.

8. 3 Cinéticas microbianas a nivel fotobiorreactor

Cómo se ha indicado, para el análisis del crecimiento microbiano de *C. vulgaris* a nivel fotobiorreactor se realizó e implementó un diseño de Taguchi donde el arreglo es del tipo $L4(2^2)$ a dos factores con 4 corridas experimentales. Los factores evaluados fueron la concentración de sustrato en una condición baja y alta. El segundo factor fue el tiempo o tipo de fotoperiodo de igual manera en una condición baja y alta. La condición baja de sustrato, el cual fue nitrato de sodio, fue de 3.6 mM y la condición alta fue de 16.4 mM. Lo que respecta al tipo de fotoperiodo, la condición baja fue de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. La condición alta de fotoperiodo fue de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

El comportamiento observado en el crecimiento de *C. vulgaris* en el fotobiorreactor construido se pudo notar con un mayor control de las condiciones de asepsia ya que iniciada la cinética, la microalga junto con el medio de crecimiento, queda completamente aislado del ambiente, lo cual bajó significativamente los problemas de contaminación presentados en la experimentación a nivel matraz, esto se vio además contribuido ya que las tomas de muestra en el fotobiorreactor se hacen a través de la succión mediante una bomba peristáltica, por lo que bajo ninguna circunstancia se expone el medio a corrientes de aire que puedan contener bacterias, hongos (esporas) o algún otro microorganismo como lo era en el caso de las tomas de muestra a nivel matraz en donde, era necesario el destapar los matraces de 250 mL y retirar muestras en campana de flujo laminar apoyándose de micropipetas estériles. Con las tomas de muestra se obtuvieron las siguientes respuestas experimentales comenzando con el crecimiento microbiano en la siguiente Figura 20.

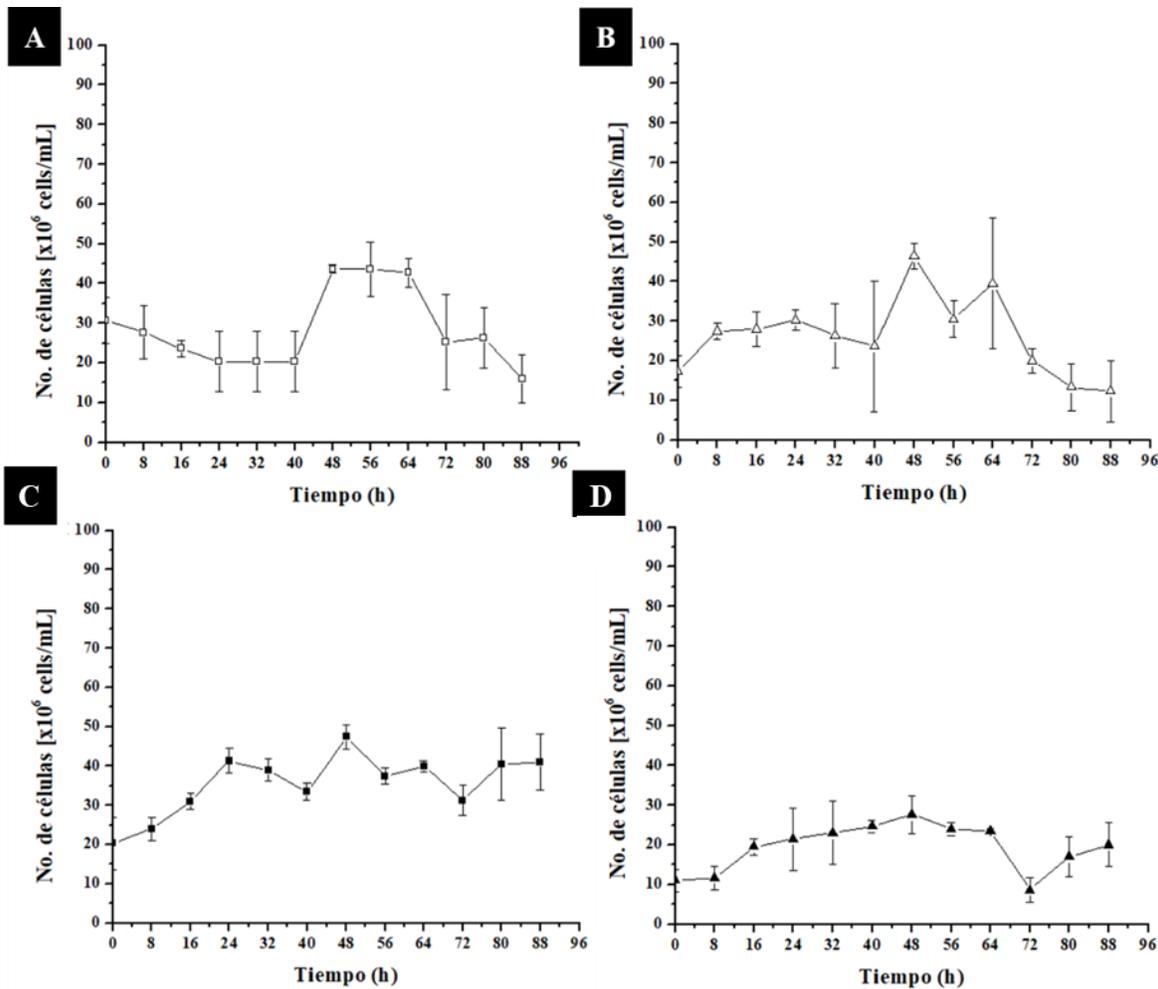


Figura 20. Crecimiento microbiano para *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05.

Como se puede observar en la Figura 20, la condición bajo fotoperiodos largos resulta favorable alcanzar una máxima concentración celular siendo hasta 50×10^6 células/mL como se muestra en la Figura 20(A) y 20(B), comenzando la fase exponencial en la hora 40; sin embargo, si se compara con el comportamiento en la Figura 20(C) y 20(D) cuyo crecimiento es en fotoperiodos bajos se puede observar que la fase exponencial comienza antes, alrededor de la hora 8, por lo que a la microalga le tomó menos tiempo adaptarse y comenzar su crecimiento en comparación con el fotoperiodo largo. Por otro lado, bajo una condición baja de sustrato y bajo fotoperiodos cortos se puede observar que al aumentar la concentración de sustrato se ve inhibido el crecimiento de la microalga alcanzando para la condición 20(C) un máximo de 50×10^6 células/mL bajo 3.6 mM de NaNO₃, en cambio al aumentar la concentración de NaNO₃ a 16.4 mM se alcanzó un máximo de 29×10^6 células/mL.

Para el análisis realizado con el diseño Taguchi tomando como respuesta el crecimiento microbiano se presenta la siguiente Figura 21, mostrando el diagrama de efectos principales para medias cuyo comportamiento fue el siguiente:

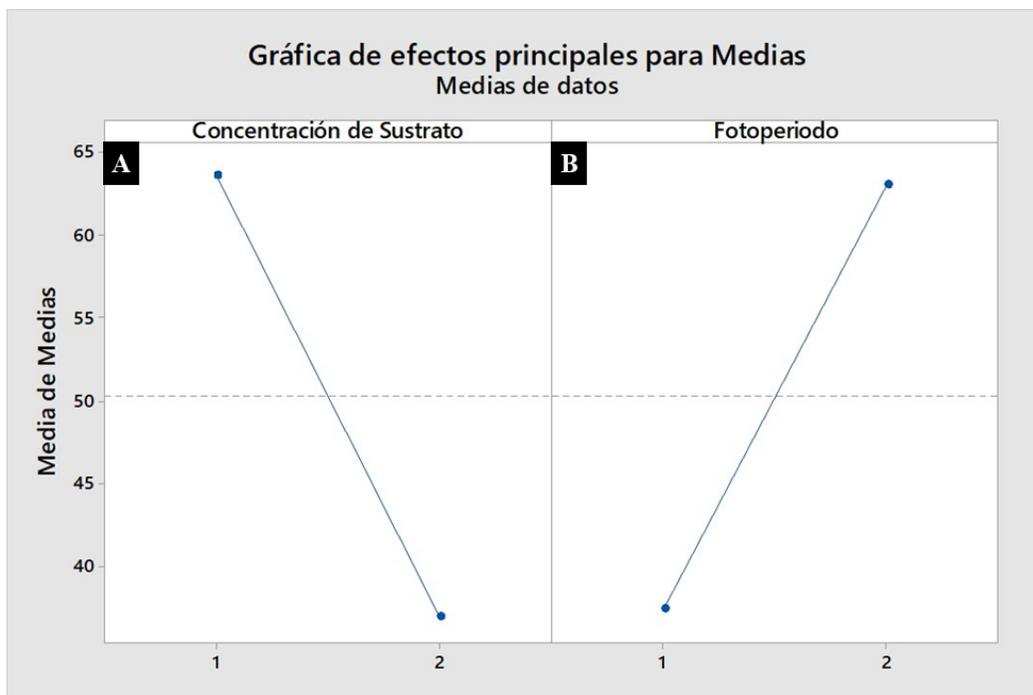


Figura 21. Análisis de efectos principales para el crecimiento celular con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO_3 y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO_3 . (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2 = fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. $n=3$, $\alpha=0.05$.

Como se puede observar en la anterior Figura 21 hay un efecto significativo para obtener los mayores índices de crecimiento microbiano en donde, a medida que se trabaja con una menor concentración de sustrato el crecimiento se ve favorecido y se promueve la división celular, por otro lado, los fotoperiodos largos afectan significativamente al crecimiento celular siendo estos favorecidos cuando la microalga se ve expuesta por mayor tiempo a la luz azul tipo LED, específicamente, en un periodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, esto habla de la capacidad de la microalga para tener una mayor absorción de la luz, comenzar su metabolismo y promover su división celular en esta longitud de onda.

Para una comprensión final del comportamiento de esta variable se realizó una prueba de ANOVA de una vía para determinar que condición experimental promueve mayor y mejor crecimiento celular, en donde se toma como hipótesis nula que todas las medias analizadas para la máxima concentración celular a la hora 48 son iguales y como hipótesis alternativa el supuesto de que no todas las medias son iguales. El comportamiento de las observaciones se muestra en la siguiente Figura 22.

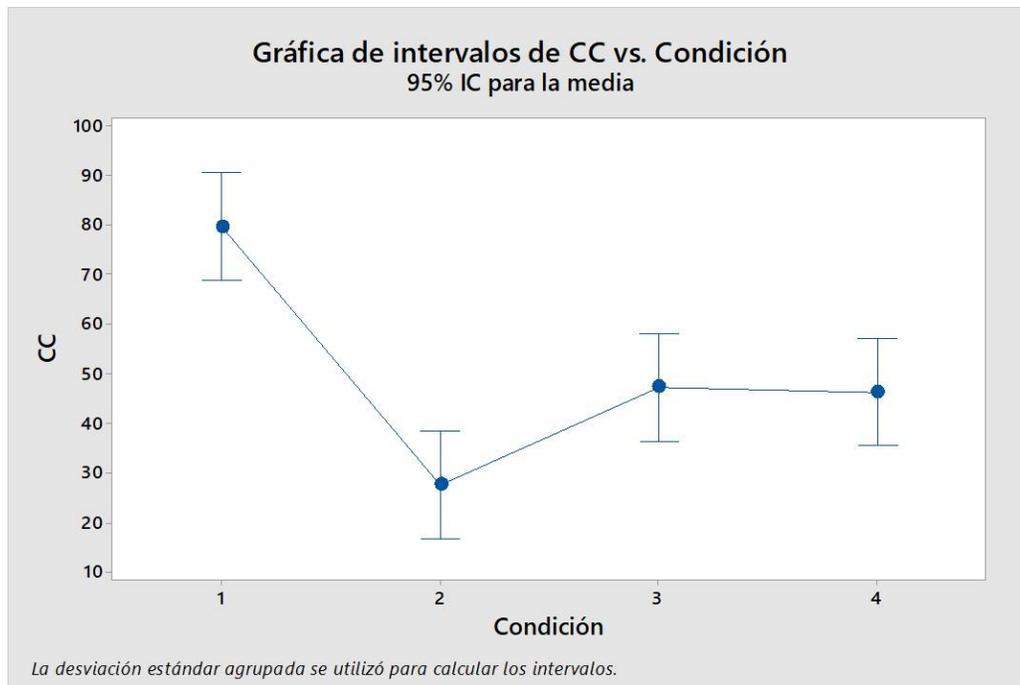


Figura 22. Análisis de ANOVA para el crecimiento celular (CC) de *C. vulgaris* con nitrato de sodio NaNO_3 como sustrato e inyecciones de CO_2 . Medio mixotrófico. (1) 3.6 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. (2) 16.4 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (3) 3.6 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (4) 16.4 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. $n=3$, $\alpha=0.05$.

Los datos obtenidos nos muestran que bajo estos cuatro niveles se tiene un valor de confiabilidad para una r^2 de 88.66% donde se tiene un *valor de F* de 20.6 y un *valor de P* de 0.000, lo que indica que al menos una condición es diferente y que por tanto se puede tener experimentos en donde se tenga una mayor producción de células con respecto al resto. Esta condición es la de una concentración baja de NaNO_3 (3.6 mM) y bajo un fotoperiodo largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) como se muestra en la Figura 22 lo que confirma los resultados obtenidos en la Figura 21 para los efectos principales. Se puede ver de igual forma que las variaciones en los resultados solo muestran traslapes bajos las condiciones de fotoperiodos cortos evaluando concentraciones bajas (3.6 mM) y altas (16.4 mM) de NaNO_3 , así como en aquella condición donde se usa alta concentración de NaNO_3 , pero un fotoperiodo corto, por lo que si se trabaja bajo estas condiciones los resultados son muy similares y no se podrá obtener un alto crecimiento microbiano.

Como segunda variable de respuesta se tiene la formación biomasa generada bajo las condiciones mixotróficas cuyo comportamiento se representa en la siguiente Figura 23.

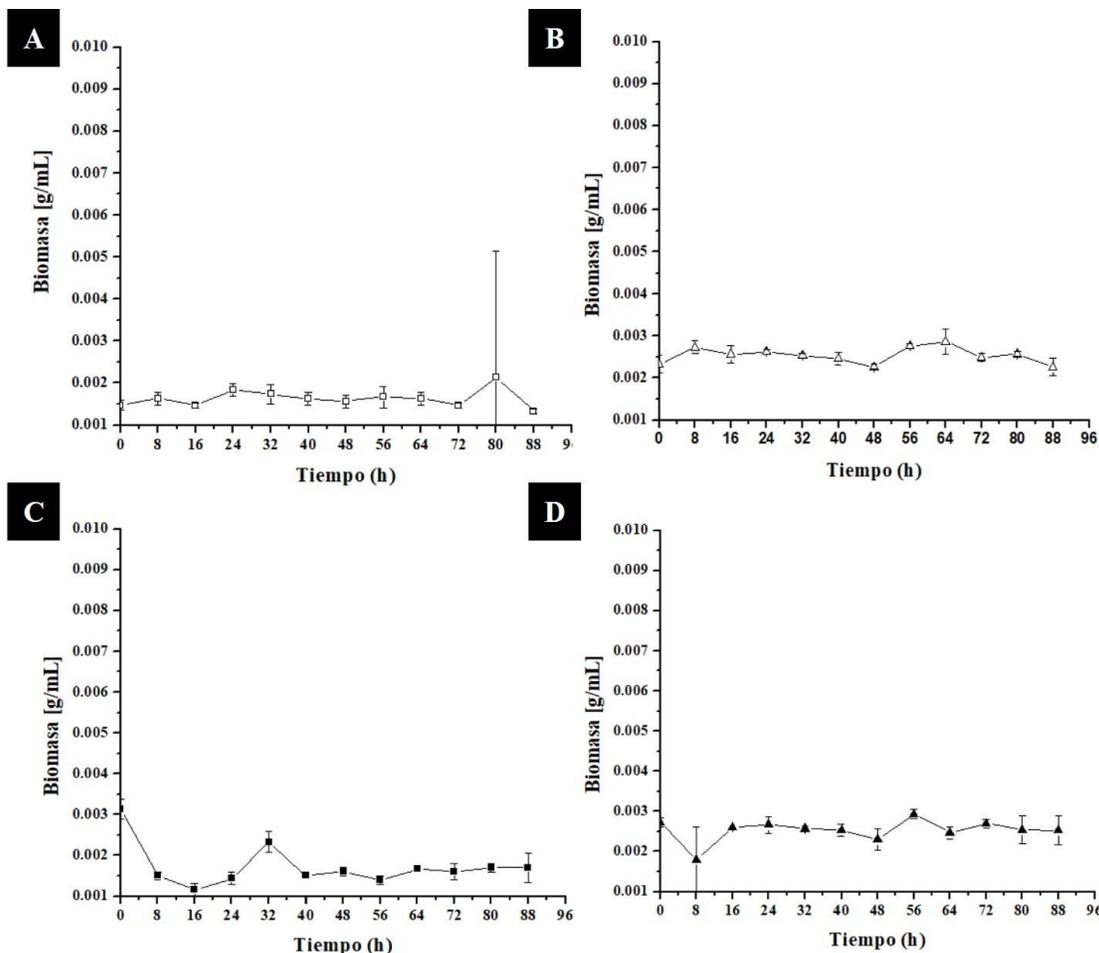


Figura 23. Biomasa generada por *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO_2 . (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. $n=3$, $\alpha=0.05$.

Con la Figura 23 se puede observar que si ocurre una formación de precipitados a lo largo de las cinéticas lo cual se debe a que la microalga cuando se divide, y como mecanismo de defensa, se aglomera en forma de racimos de uva, se puede observar que, en la mayoría de las condiciones, conforme se acerca el final de la experimentación se obtiene el máximo de biomasa, alrededor de la hora 56 cuando se trata de altas concentraciones de sustrato (16.4 mM).

En cuanto al comportamiento del diseño de Taguchi se presenta a continuación la siguiente Figura 24.

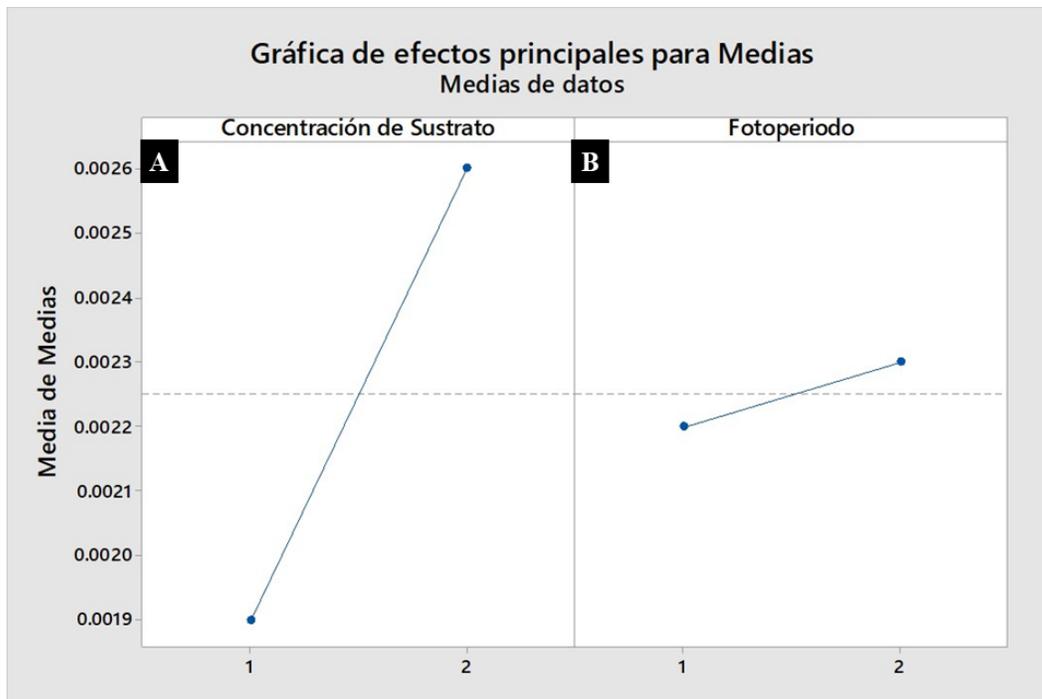


Figura 24. Análisis de efectos principales para la biomasa con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO_3 y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO_3 . (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. $n=3$, $\alpha=0.05$.

A medida que hay un aumento en la concentración de NaNO_3 hay un aumento de la biomasa generada; sin embargo, si se compara con lo obtenido en la Figura 20 del crecimiento celular (CC) se observa que a una menor concentración de NaNO_3 hay una mayor cantidad de células, esto quiere decir que cuando se trabaja con una concentración de 3.6 mM de NaNO_3 la microalga al verse limitada en el sustrato busca su preservación y por ello se ve inducida su división para generar nuevas células pero que, no quiere decir que estas células necesariamente tengan que desarrollar tamaños grandes que aumenten su peso. Por otro lado, cuando se trabaja con la condición alta de sustrato (16.4 mM) no se promueve con gran medida la división y por ello, las células formadas disponen de abundante sustrato para aumentar significativamente su tamaño, con este fenómeno al realizar pruebas para biomasa como la de peso seco, es que se detecta un aumento en el peso registrado de los precipitados celular y por ello ocurre dicho aumento en la biomasa. Para corroborar esta hipótesis se realizó una prueba *Post-hoc* de *correlaciones de Pearson* entre el crecimiento celular y la biomasa generada en donde se obtuvo que no hay una correlación o relación directamente proporcional entre las respuestas. El valor obtenido de la correlación es de 0.167, es decir que el modelo y el comportamiento solo puede explicar el 16.7% del comportamiento o, dicho de otra manera, solo este porcentaje se tiene de confiabilidad para que se tenga un comportamiento lineal de ambas variables. Si el valor para la *correlación de Pearson* es cercano al 100%, quiere decir que hay un comportamiento proporcional entre las variables, es decir, a menor crecimiento celular, menos biomasa y a mayor crecimiento celular mayor biomasa. Además del hecho o supuesto de que la limitante de sustrato puede promover la división celular como mecanismo de supervivencia también se ha observado que durante la

cinética existe un fenómeno de precipitación celular en forma de aglomeraciones (racimos de uvas) lo cual puede ser la causa que para las tomas de muestra no se tenga una extracción completa de las células que favorezca este comportamiento línea, es por ello que se propone el uso de un agitador metálico para mantener en constante agitación del medio, ya que para esta experimentación la agitación se llevó a cabo cada 8 horas por medio de burbujas de CO₂.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de ANOVA de una vía para observar si hay diferencias significativas en cuanto a las condiciones experimentales y la formación de biomasa. El comportamiento fue el siguiente de la Figura 25.

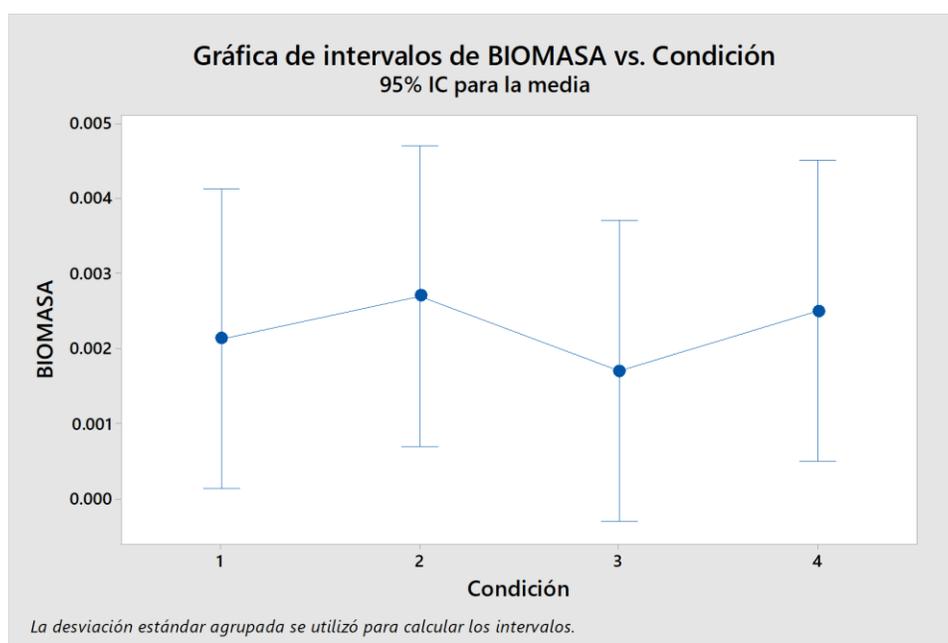


Figura 25. Análisis de ANOVA para la biomasa de *C. vulgaris* con nitrato de sodio NaNO₃ como sustrato e inyecciones de CO₂. Medio mixotrófico. (1) 3.6 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. (2) 16.4 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (3) 3.6 mM de y 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. (4) 16.4 mM de y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, $\alpha=0.05$.

Con base en la Figura 25 y tras el análisis estadístico, se reporta un valor de r^2 de 8.78% lo cual indica que no hay diferencias significativas en cuanto a la condición de crecimiento y la formación de biomasa, además de eso se reporta un *valor de F* de 0.26 y un *valor de P* de 0.855, por arriba de 0.005, lo cual reafirma que la formación de biomasa no se ve afectado o beneficiado al variar la concentración de sustrato o el tipo de fotoperiodo especificado en el diseño.

Por otro lado, y como parte del monitoreo, se llevó a cabo el registro del pH en el medio de crecimiento. Este parámetro es necesario ya que a través de él se puede observar si la cinética de crecimiento se está desarrollando de manera correcta, si el pH va en aumento a lo largo del tiempo, se puede decir que el crecimiento se está llevando de manera correcta ya que las microalgas, como *C. vulgaris*, modifican el medio de crecimiento hasta alcanzar un pH óptimo de 9.8. Las cinéticas comenzaron bajo un pH en el medio alrededor de 5 y el comportamiento es el de la siguiente Figura 26.

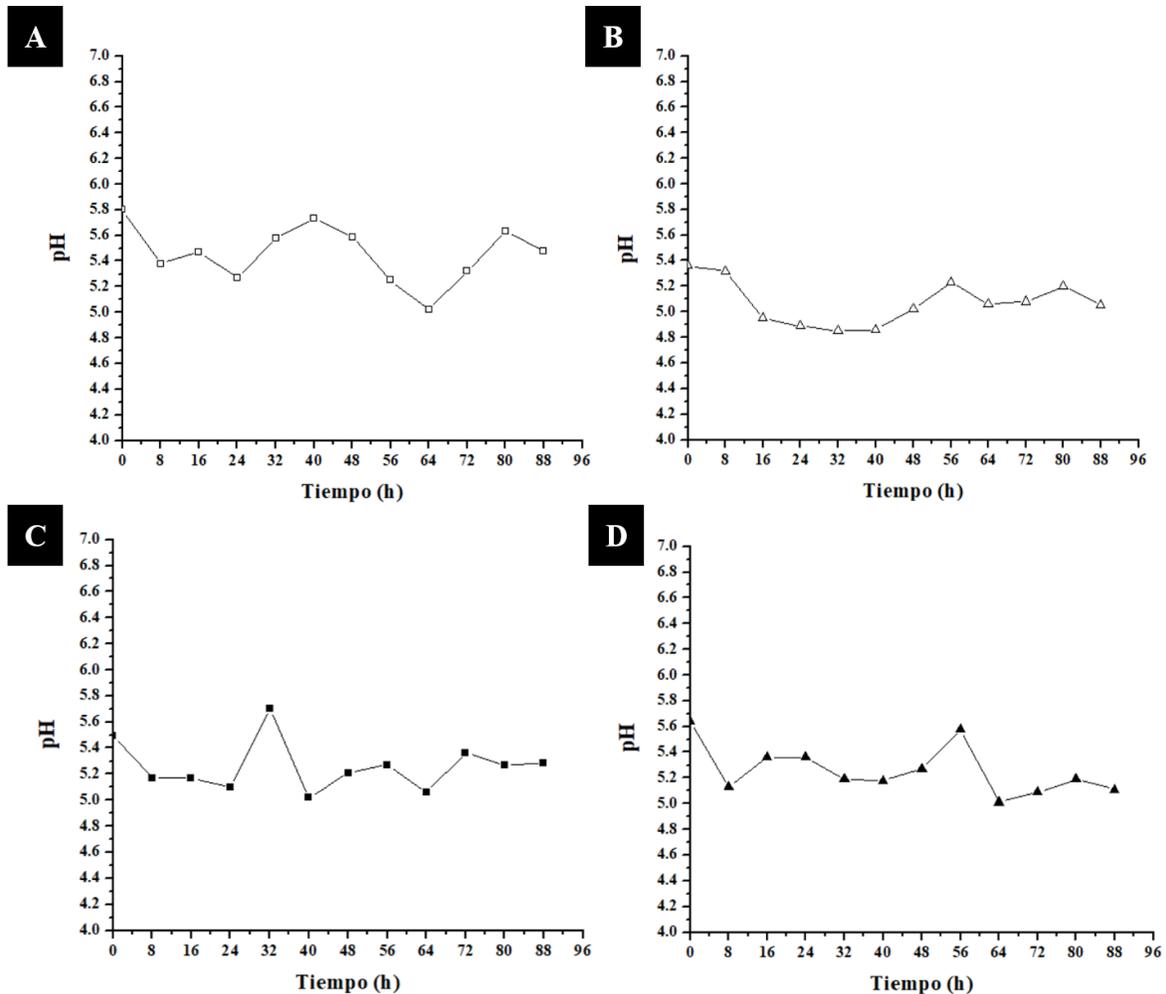


Figura 26. pH en medio mixotrófico de *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, $\alpha=0.05$.

Como se puede observar en la Figura 26, no hubo un aumento significativo en el pH a lo largo de la experimentación acercándose a la basicidad (un valor de 10) lo cual se puede deber a lo siguiente:

1. Debido al poco aumento en la cantidad de células (división celular), no se tuvo una concentración elevada de ellas en el medio como para afectar de manera directa y modificar el pH inicial de la experimentación, quedando como supuesto que, con un aumento mayor de las células será posible tener aumentos mayores en el pH.
2. Al tratarse de un crecimiento mixotrófico, es decir, con el uso de una fuente inorgánica de carbono, en comparación con lo experimentado a nivel matraz en donde el crecimiento fue fotoheterotrófico (ausencia de fuente de carbono inorgánico como el CO₂) se pudo ver afectado el pH y por tanto no inducir el crecimiento celular.

Para ello a continuación se realizó la *comparación de Pearson* entre el pH y el crecimiento celular para ver si pudo haber un efecto sobre la división celular y se obtuvo que, solo se puede tener una relación del 27%, lo cual no es suficiente para sustentar que el crecimiento celular acidifica el medio a lo largo del crecimiento, y esto cobra sentido ya que, por lo observado en el apartado del crecimiento celular a nivel matraz, el pH tiene a aumentar hasta alcanzar valores cercanos a 10, recordando que el punto óptimo para pH en medio de crecimiento de *C. vulgaris* es de 9.8. Por lo que solo queda el sustentar que esta disminución del pH con base al crecimiento celular es por la saturación de CO₂ en el medio de crecimiento a lo largos de los 5 días experimentales ya que se ha demostrado que cuando el CO₂ se disocia en un medio acuoso, se forma ácido carbónico en el caso de que este carbono no sea difundido por el medio y salga al ambiente o no sea metabolizado, en este caso por la microalga, por tanto se recomienda un análisis del efecto del CO₂ sobre el crecimiento celular con la finalidad de analizar bajo que concentraciones, flujo y tiempo se tiene como tolerancia para el crecimiento. Lo anterior se ve reforzado ya que a diferencia del número de células formadas a nivel matraz con respecto a nivel fotobiorreactor, se tuvo una disminución concluyendo que, al tener un medio ácido, no se ve promovido el crecimiento celular.

Aplicando la metodología de Taguchi, el comportamiento para el pH es el siguiente de la Figura 27.

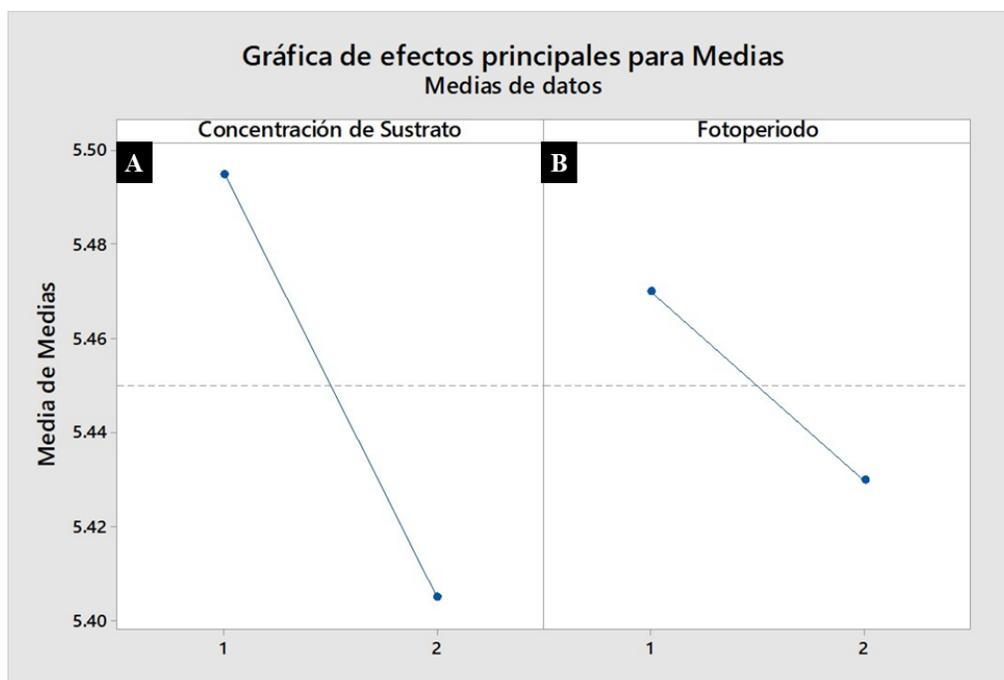


Figura 27. Análisis de efectos principales para el comportamiento del pH en el medio de crecimiento con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO_3 y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO_3 . (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2 = fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. $n=3$, $\alpha=0.05$.

Se puede observar con la Figura 27 que el pH se ve disminuido cuando ocurren aumentos en la concentración NaNO_3 al igual que cuando se aumenta el tiempo del fotoperiodo y en donde el mayor efecto se tiene con respecto la concentración de sustrato, es decir que para poder tener cinéticas en donde no ocurra una disminución significativa del pH y este a su vez afecte el crecimiento celular, se debe de trabajar bajo la concentración de 3.6 mM, lo cual coincide con que bajo esta condición se promueve el crecimiento microbiano ya que estas variaciones no inhibirán el crecimiento.

Dentro de los objetivos de este trabajo, además de aumentar las eficiencias en los crecimientos de las microalgas con respecto a la formación de nuevas células y biomasa, es el aprovechar las moléculas o metabolitos en su interior ya que hay evidencia de una gran gama de grupos funcionales que pueden ser aprovechados para uso biotecnológico. Uno de estos usos como ya se han mencionado con antelación es la actividad antioxidante. Por tanto y después de la extracción correspondiente se presenta la siguiente Figura 28 para la cuantificación de metabolitos polares o hidrosolubles (como los polifenoles) así como los no polares o liposolubles (como los terpenos) a través de la estabilidad de radicales libres sintéticos.

Como parte del análisis se monitorio el consumo de sustrato para el cálculo de los parámetros cinéticos en donde el comportamiento se muestra en la siguiente Figura 28

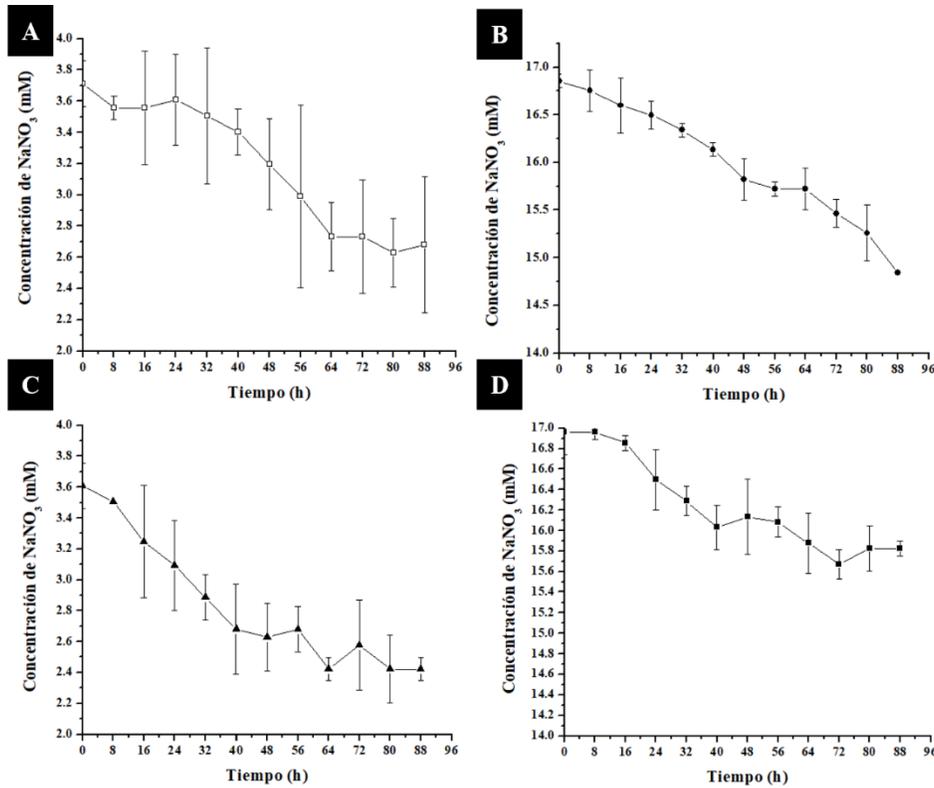


Figura 28. Consumo de sustrato en cinéticas microbianas de *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. $n=3$, $\alpha=0.05$.

Con la Figura 28 se puede observar que el crecimiento microbiano si se debe al aprovechamiento del NaNO₃ y que por tanto el consumo de sustrato puede tener, o no, un efecto directo sobre la división celular y la síntesis de metabolitos con actividad antioxidante, es por ello que más adelante se presentan los resultados complementarios de los metabolitos para concluir el análisis.

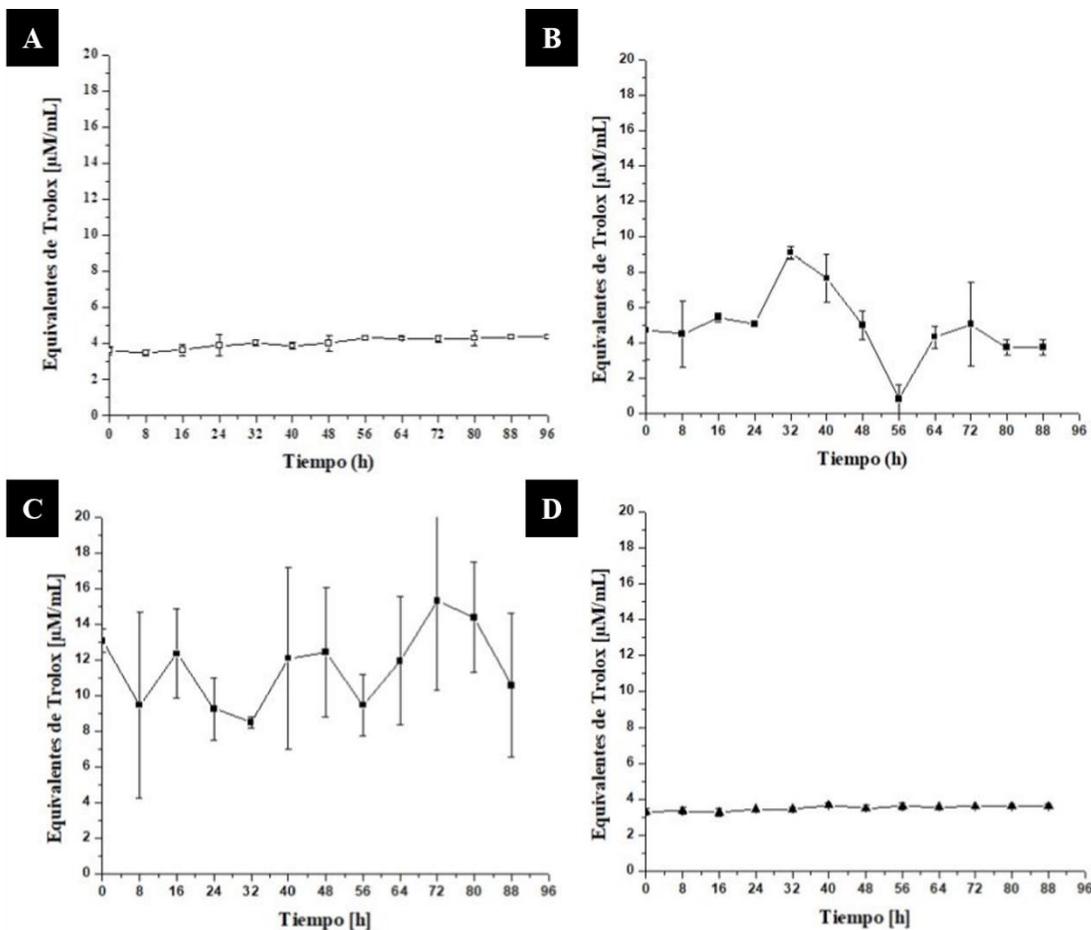


Figura 29. Actividad antioxidante a través del método de ABTS^{•+} para *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05.

En la Figura 29 se puede mencionar que bajo cualquiera de las condiciones a nivel fotobiorreactor se promueve la síntesis de metabolitos secundarios polares con actividad antioxidante y que por tanto *C. vulgaris* contiene dichas moléculas como posible mecanismo de defensa.

Por otro lado, dentro de la misma Figura 29 se puede observar que se mantiene una máxima actividad antioxidante dentro de la condición de bajo nivel de sustrato y bajo fotoperiodo, aunque también hay actividad bajo un alto nivel de sustrato y un alto fotoperiodo; sin embargo, este resultado solo muestra actividad bajo ciertas horas del crecimiento, específicamente dentro de las horas 24 a la 48, diferente a lo observado en la Figura 29C en donde la actividad se mantiene e incluso va en aumento de la hora 40 a la hora 72.

Para una conclusión reforzada a continuación se presenta el grafico resultante del análisis de Taguchi en la Figura 30.

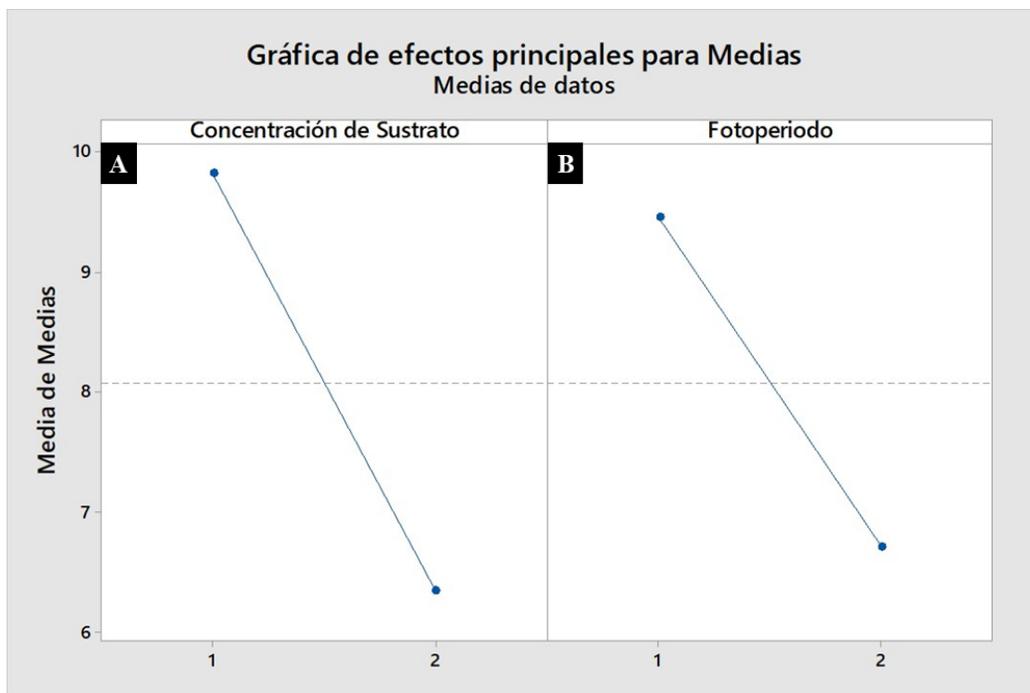


Figura 30. Análisis de efectos principales para la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO₃ y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO₃. (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. n=3, α=0.05.

Dentro de la Figura 30 se puede ver claramente que la concentración de sustrato promueve la respuesta mayor para los metabolitos antioxidantes y que esta a su vez se ve favorecida cuando se trabaja bajo concentraciones de 3.6 mM. Además de esto el fotoperiodo juega un papel importante para la misma promoción de la actividad a diferencia de lo observado en la Figura 24 ya que la pendiente es más pronunciada y tiene similitud con la generada para el sustrato de la Figura 30. El fotoperiodo que favorece la respuesta antioxidante es aquel de 8 horas de luz y 16 de oscuridad.

Para complementar el análisis se continua con la determinación de la fracción no polar (terpenos) de los antioxidantes contenidos en la microalga, ya que el método de ABTS^{•+} mide de manera general a los metabolitos tanto polares (polifenoles) así como no polares (terpenos) con dicha actividad. De esta manera a continuación se presenta la siguiente Figura 31.

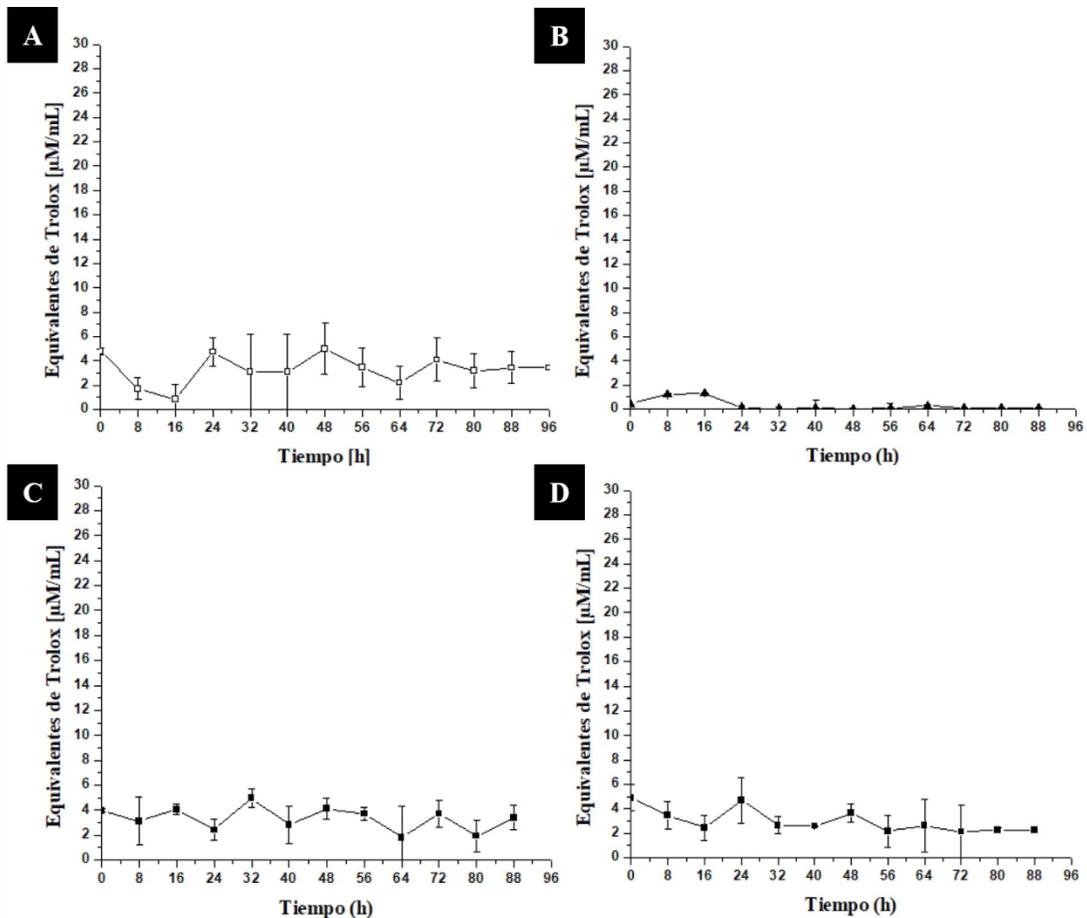


Figura 31. Actividad antioxidante a través del método de DPPH^{*} para *C. vulgaris* en medio mixotrófico, inyecciones de 20 s de CO₂. (A) 3.6 mM de nitrato de sodio y (B) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos largos, es decir de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. (C) 3.6 mM de nitrato de sodio y (D) 16.4 mM de nitrato de sodio, todas las corridas anteriores fueron realizadas bajo fotoperiodos cortos, es decir de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura interna de 30 °C aproximadamente. n=3, α=0.05.

En la Figura 31 se puede observar que *C. vulgaris* de igual forma al ser cultivada en medio mixotrófico a nivel matraz conserva la habilidad para sintetizar metabolitos con actividad antioxidante en donde dichos metabolitos sean de características no polares, se puede observar que la mayoría de las condiciones experimentales muestran señales con actividad, pero de igual manera se puede observar que hay una condición en donde la microalga no es capaz de sintetizarlos con una significancia grande.

Siguiendo con los concluyentes del análisis Taguchi se presenta la siguiente Figura 32 para los efectos principales con respecto a los metabolitos no polares.

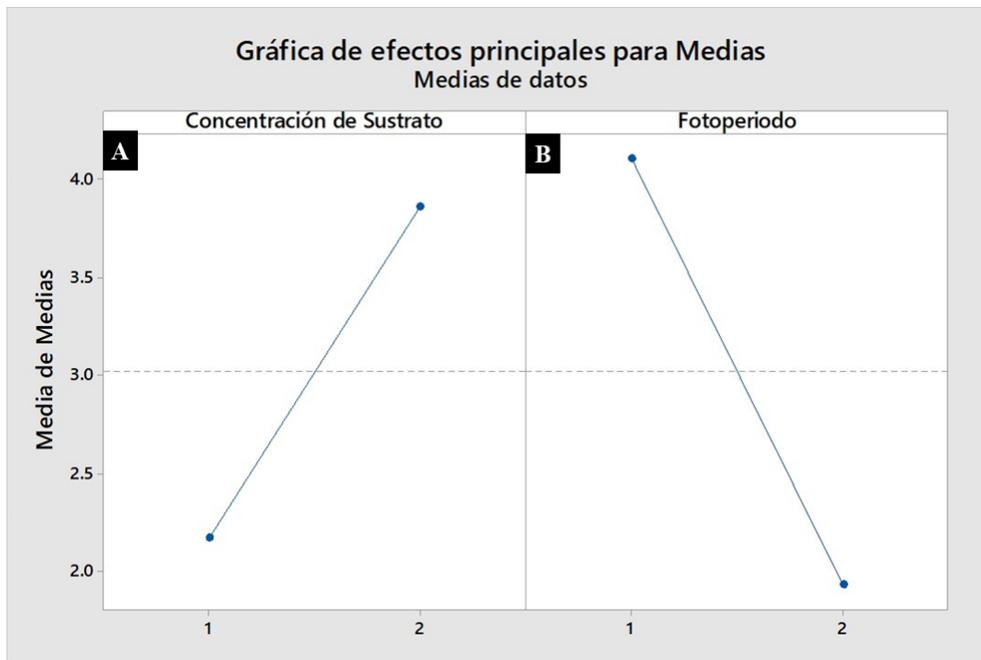


Figura 32. Análisis de efectos principales para la actividad antioxidante por el método de DPPH* con respecto a la concentración de nitrato de sodio NaNO_3 y tipo de fotoperiodo. (A) 1=3.6 mM, 2=16.4 mM de NaNO_3 . (B) 1= fotoperiodo 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, 2= fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. $n=3$, $\alpha=0.05$.

Para esta situación se puede observar con la Figura 32 que el fotoperiodo es el que muestra o influye sobre la mayor y mejor respuesta evaluada y que, dentro de ello, los fotoperiodos cortos de 8 horas de luz promueven la síntesis; sin embargo, para este caso la concentración de sustrato de 3.6 mM afecta la síntesis, es decir, el comportamiento de la respuesta es inverso a lo observado en la Figura 32(B), esto quiere decir que es posible seleccionar el tipo o naturaleza de metabolitos para su posible aplicación si se trabaja bajo condiciones bajas o altas de sustrato y con ello desarrollar productos específicos.

De esta forma se realizó una *correlación de Pearson* a diferentes variables de respuesta: la primera de ellas es para analizar la relación del crecimiento celular con respecto la actividad antioxidante tanto para $\text{ABTS}^{+\cdot}$ como para DPPH*, para concluir si a medida que se consigan más número de células sin importar su peso, tamaño o volumen se puede tener una proporción con respecto a dicha actividad. Como segundo análisis se realizó lo mismo, pero con respecto a la biomasa generada para saber si medida de que se tiene células más grandes o con mayor peso se pueden tener una mayor cantidad de metabolitos producidos y contenidos en la microalga. Finalmente se realizó una correlación sobre la respuesta antioxidante bajo los dos métodos experimentales.

Correlación entre crecimiento celular y actividad antioxidante

El valor obtenido para la correlación entre el crecimiento celular y la síntesis de metabolitos secundarios de carácter polar a través del ABTS^{•+} es de -0.055 con un *valor de P* de 0.866 por arriba del valor de alfa de 0.005 , es decir que no se encuentra una proporcionalidad entre la síntesis de estas moléculas con el número de células formadas, es decir, si hay un efecto positivo o negativo en dicha síntesis es debido a la condición de crecimiento más no al número de células formadas. Por otro lado, el valor obtenido para la correlación entre el crecimiento celular y la actividad de metabolitos no polares medidos a través del radical de DPPH[•] fue de 0.767 lo que quiere decir que el comportamiento explica un 76.7% de confiabilidad en donde dependiendo del número de células se tendrá una mayor o menor número de metabolitos con dicha actividad, el *valor de P* fue de 0.004 estando por debajo de 0.005 lo cual permite tener un rango de error aceptable y confiable que sustenta sentencia anterior. Con ello se puede concluir que la actividad antioxidante se ve afectada por la condición de crecimiento de manera positiva o negativa; sin embargo, cuando la condición experimental favorece el crecimiento celular, se podrá tener una señal positiva y significativa con respecto a la síntesis de metabolitos no polares como lo pueden ser los terpenos.

Correlación entre biomasa generada y actividad antioxidante

En cuanto a la biomasa generada y si está, a medida que se aumenta, puede tener un aumento de la actividad antioxidante se observó que la *correlación de Pearson* es de -0.208 por lo que no se explica una dependencia para dicha actividad y donde el *valor de P* es de 0.517 lo cual no muestra relación, esto para ABTS^{•+}. Para el caso con DPPH[•] se tuvo un valor de 0.080 lo cual sigue siendo bajo y no demuestra dependencia como en el caso anterior con respecto al crecimiento celular, además de que el *valor de P* es elevado el cual es de 0.805 . Por lo que se puede concluir que solo la condición experimental tiene un efecto sobre la síntesis de metabolitos secundarios, pero no hay una relación directa con la biomasa, es decir la generación de poca o demasiada biomasa no aumentará o disminuirá de manera proporcional la actividad antioxidante.

Correlación entre síntesis de metabolitos con actividad antioxidante de naturaleza polar y no polar.

Finalmente se llevó a cabo el análisis entre si la síntesis de metabolitos secundarios tanto polares como no polares se hace de manera proporcional, es decir, si hay un aumento en la cantidad de metabolitos polares ocurrirá el mismo aumento en la síntesis de metabolitos no polares. Para ello se tuvo un valor de la *correlación de Pearson* de 0.187 en donde queda de manifiesto que el comportamiento puede explicar o tener certeza del comportamiento en hasta un 18.7% lo cual no es recomendable para indicar que el comportamiento será proporcional en todos los casos experimentales, además de que el valor de alfa es de 0.561 . Como se puede observar, es factible el crecimiento de *C. vulgaris* a nivel fotobiorreactor usando una fuente de luz LED ya que promueve la división celular, generación de biomasa y la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antioxidante tanto polares como no polares y para ello a continuación se presenta la caracterización cinética microbiana con base a los resultados obtenidos.

En cuanto a la caracterización enzimática microbiana se tiene que para la condición de crecimiento de *C. vulgaris* de 3.6 mM de NaNO₃ y un fotoperiodo alto de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad se tiene un tiempo de duplicación (t_d) de 4.32 horas, una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.0266 h⁻¹ y una velocidad de división (δ) de 0.2314 h⁻¹. En cuanto a los rendimientos calculados se tiene un valor de $Y_{x/s}$ de 2.94 y $Y_{p_ABTS^{+}/s}$ de 3.83 así como $Y_{p_DPPH^{+}/s}$ de 4.8. Para la condición de 16.4 mM de NaNO₃ y un fotoperiodo bajo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad se tiene un tiempo de duplicación (t_d) de 4.3287 horas, una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.0264 h⁻¹ y una velocidad de división (δ) de 0.231 h⁻¹. Los rendimientos calculados se tiene un valor de $Y_{x/s}$ de 2.21 y $Y_{p_ABTS^{+}/s}$ de 3.37 así como $Y_{p_DPPH^{+}/s}$ de 0.0048. Para la condición de 3.6 mM de NaNO₃ y un fotoperiodo bajo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad se tiene un tiempo de duplicación (t_d) de 3.76 horas, una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.0465 h⁻¹ y una velocidad de división (δ) de 0.2658 h⁻¹. En cuanto a los rendimientos calculados se tiene un valor de $Y_{x/s}$ de 2.75 y $Y_{p_ABTS^{+}/s}$ de 17.79 así como $Y_{p_DPPH^{+}/s}$ de 2.4. Finalmente, para la condición de 16.4 mM de NaNO₃ y un fotoperiodo alto de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad se tiene un tiempo de duplicación (t_d) de 3.85 horas, una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.0424 h⁻¹ y una velocidad de división (δ) de 0.2594 h⁻¹. En cuanto a los rendimientos calculados se tiene un valor de $Y_{x/s}$ de 5.6 y $Y_{p_ABTS^{+}/s}$ de 10.83 así como $Y_{p_DPPH^{+}/s}$ de 10. Por lo que se puede observar que la mejor condición para el crecimiento es aquellas bajo un fotoperiodo bajo de 8 horas de luz ya que esto promueva al crecimiento celular al igual que hay un aumento en los rendimientos con base a la actividad antioxidante y además se puede concluir que la concentración de sustrato afecta la división celular y por tanto el crecimiento ya que de las cuatro corridas experimentales en el diseño Taguchi se puede observar que la aclimatación más corta y el comienzo del crecimiento microbiano es bajo una condición de bajo sustrato (3.6 mM de NaNO₃) así como un baja exposición a la luz LED azul (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad)

IX. CONCLUSIONES

- Con el trabajo realizado, y hablando del rubro del diseño, maquinado e instrumentación de fotobiorreactor se puede concluir que este dispositivo cuenta con los medios necesarios para detectar señales bioquímicas como; pH, temperatura y concentración de oxígeno, así como regulación de la intensidad lumínica en tiempo real, permitiendo el seguimiento y caracterización de la cinética de crecimiento de las microalgas. Además, por su diseño y componentes, puede ajustarse para el crecimiento de una amplia gama de microalgas, por lo que se pueden incrementar los rendimientos de biomasa y metabolitos primarios y secundarios que actualmente están disponibles a nivel industrial. Por otro lado, se puede mencionar que el fotobiorreactor diseñado se encuentra en proceso de registro como modelo de utilidad con número de registro MX/u/2021/000559, considerándose un equipo con un diseño único que puede favorecer la investigación de microalgas., por lo que es posible su escalada. Finalmente, se puede concluir que el fotobiorreactor mide en tiempo real las variables bioquímicas con las que se pueden optimizar las condiciones de crecimiento de las microalgas, beneficiando a los sectores de alimentación, salud y energía.
- En cuanto a las cinéticas microbianas a nivel matraz, y tras el análisis del diseño de cribado, se puede concluir que *C. vulgaris* es una especie de microalga que puede crecer favorablemente en medio fotoheterotrófico, con acetato de sodio o glicerol como sustrato. Su crecimiento; sin embargo, se ve favorecido al trabajar con acetato de sodio, ya que se observó una mayor formación de células, biomasa y formación de productos con actividad antioxidante. Además, la concentración del sustrato tuvo un efecto significativo en la cinética de *C. vulgaris*, ya que a altas concentraciones se puede inhibir el crecimiento específicamente en la mezcla 3N-BBM+V y medio glicerol, lo que puede ser por saturación e interferencia en las cadenas metabólicas o impidiendo que el sustrato esté disponible para las microalgas. Por otro lado, se puede concluir que el tipo de fotoperiodo tiene un efecto significativo en el crecimiento y síntesis de metabolitos con actividad antioxidante, ya que hubo mayor actividad en fotoperiodos largos. Finalmente, se puede concluir que *C. vulgaris* es capaz de sintetizar metabolitos con actividad antioxidante y almacenarlos en el interior de la célula como protección contra el estrés, y que estas habilidades podrían explotarse a nivel biotecnológico.
- La mejor condición de crecimiento a nivel matraz fue de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (fotoperiodo largo), con acetato de sodio como sustrato y con una concentración de 0.0005 g/L generando una respuesta de 0.65 mg/mL para ABTS^{•+} y 0.62 mg/mL para DPPH[•].
- Para las cinéticas a nivel fotobiorreactor, y de igual forma con el diseño de Taguchi, es posible concluir que *C. vulgaris* conserva y sigue desarrollando un correcto crecimiento en donde, se ve promovida la síntesis de metabolitos con actividad antioxidante tanto para moléculas polares (polifenoles) como no polares (terpenos) y que dicho crecimiento se ve favorecido fajo una concentración baja de sustrato como

lo es el NaNO_3 (3.6 mM) y bajo un corto tiempo de fotoperiodo (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad). Sin embargo, durante el crecimiento a nivel matraz se tuvo un mayor número de células, pero tiempos de duplicación menores por lo que es posible decir que el fotobiorreactor reúne las condiciones adecuadas en el medio de crecimiento para favorecer el desarrollo de microalgas como lo es *C. vulgaris*; sin embargo, es posible que el número de células no se vea favorecido ya que el fotobiorreactor cuenta con inyecciones de CO_2 lo cual promueve que el medio acido se acidifique y por tanto la microalga no crezca satisfactoriamente al no alcanzar un pH de 9.8 por lo que se sugieren nuevos experimentos en donde se pueda medir la difusión del gas y su aprovechamiento en el medio así como la tolerancia en el dispositivo para que *C. vulgaris* no se vea afectada en su desarrollo.

- La mejor condición en cuanto a la promoción en la síntesis de metabolitos con actividad antioxidante a nivel fotobiorreactor fue bajo una concentración de 3.6 mM NaNO_3 y un bajo tiempo de fotoperiodo el cual es de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, generando una respuesta de $16 \mu\text{M}/\text{mL}$ para ABTS^{*+} y $6 \mu\text{M}/\text{mL}$ DPPH^* .
- Con los resultados obtenidos, y a lo largo de las cinéticas tanto a nivel matraz como fotobiorreactor, fue posible determinar actividad antioxidante en cada toma de muestra. Dicha actividad evaluada con los métodos del radical de ABTS^{*+} y DPPH^* indican que *C. vulgaris* sintetiza metabolitos de naturaleza liposoluble e hidrosolubles y que son producidos como mecanismo de defensa.
- Se puede concluir de manera general que para ambos casos, matraz y fotobiorreactor, el tipo, concentración de sustrato y tiempo de exposición a la luz (fotoperiodo) influye de manera directa en el crecimiento de *C. vulgaris* y que para todo este trabajo la mejor condición de crecimiento es a nivel fotobiorreactor, con nitrato de sodio como sustrato, a una concentración de 3.6 mM y un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad con base a su caracterización cinética ya que es donde se presenta el menor tiempo de duplicación celular.
- El cultivo a nivel fotobiorreactor es ideal para propiciar las condiciones de inocuidad y monitoreo en tiempo real en cinéticas de microalgas, específicamente de *C. vulgaris*; sin embargo es necesarios hacer mejoras para un aumento en los rendimientos como lo es un sistema de agitación continua ya que, aunque se tuvo un menor tiempo de duplicación en comparación con la experimentación a nivel matraz y, además se redujo el tiempo de trabajo de 10 a 5 días, a paso del tiempo el burbujeo no es suficiente para mantener en total movimiento a las aglomeraciones de microalgas ocurriendo una sedimentación y por tanto una disminución en el crecimiento y consumo de sustrato.

X. ASPECTOS RELEVANTES



Artículo en la revista *Food Science and Technology* con el título “*Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review”. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.37320>. Año 2021.



Artículo en la revista *MDPI/Molecules* con el título “*Antioxidant Activity and Kinetic Characterization of Chlorella vulgaris Growth under Flask-Level Photoheterotrophic Growth Conditions*”. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196346>. Año 2022.



PATENTE de diseño de fotobiorreactor en la categoría de **MODELO DE UTILIDAD**. Año de otorgamiento de la innovación, 2023. Registro: MX/u/202100055. Año 2023.



Publicación de participación en el Capítulo titulado “*Vitamins from microalgae*” para el libro “*Handbook of Food and Feed from Microalgae*” de la revista *ELSEVIER*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99196-4.00026-7>.

ELSEVIER



Formación de recurso humano: Titulación en la modalidad de “Tesis” de las alumnas Evelyn Ramírez Acosta y Miranda Valeria Martínez Olguín con el trabajo titulado “*Determinación de la actividad antioxidante de la microalga Chlorella vulgaris*”. Fecha de obtención del título: 25 de noviembre del 2022.



Participación como profesor investigador del programa de VERANO DELFÍN. Año de participación: verano del 2023.



Participación como ponente en el congreso ICTI 2020 con el trabajo titulado “Análisis del crecimiento cinético de Chlorella vulgaris bajo condiciones de cultivo heterotrófico para la optimización EN LA SINTESIS DE METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS” celebrado en Morelia Mich.



Participación como ponente en el congreso ICTI 2021 con el trabajo titulado “Caracterización cinética de la microalga Chlorella vulgaris a nivel matraz con glicerol como sustrato” celebrado en Morelia Mich.



Participación como ponente en el congreso ICTI 2022 con el trabajo titulado “Diseño, construcción e instrumentación de fotobiorreactor para crecimiento de microalgas” celebrado en Morelia Mich.



Participación como ponente en el congreso AMIDIQ en modalidad oral con el proyecto titulado “Caracterización cinética y actividad antioxidante de Chlorella vulgaris en medio fotoheterotrófico a nivel matraz con glicerol como sustrato” celebrado en Puerto Vallarta en agosto del 2022.



Se llevó a cabo la presentación del trabajo titulado “Crecimiento y caracterización de Chlorella vulgaris en medio fotoheterotrófico a nivel matraz para diseño y construcción de fotobiorreactor” dentro del marco del congreso de ciencias básicas celebrado en el Tecnológico Nacional de México campus morelia en modo cartel. Año 2022.



Se encuentra en trabajo para su envío y pendiente de aceptación el trabajo titulado “Design, Construction and Instrumentation of Photobioreactor for Microalgae Growth” para la revista Brazilian Archives of Biology and Technology. Año 2023.

XI. AGRADECIMIENTOS

A los donativos parciales otorgados por la convocatoria de Proyectos de Desarrollo e Innovación Tecnológica para Estudiantes 2020 del TecNM (**8959.20-P**), convocatoria del año 2021 (**7662.21-P, 10019.21-P**) y del año 2022 (**13825.22-P**) y a la **Convocatoria 2023 Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación (Proyecto 16898.23-P)**, para los Institutos Tecnológicos Federales.

Finalmente, al “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (**CONACyT**) a través del financiamiento para la **beca de Doctorado 0456297331**, así como al apoyo total de mi Director el DC. Juan Carlos González Hernández, al DCIE. Juan Alfonso Salazar Torres, a mis compañeros de trabajo y de laboratorio, a mis amigos fuera de esta institución y sin duda alguna a mi familia que siempre está allí para animarme y motivarme.

XII. REFERENCIAS

- Acién, F., González-López, C., Fernández, J. & Molina, E. (2012). Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 96, 577–586
- Agregán, R., Munekata, P.E., Franco, D., Carballo, J., Barba, F.J. & Lorenzo, J.M. (2018). Antioxidant potential of extracts obtained from macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and micro-algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) assisted by ultrasound. *Medicines*, 5, 33.
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Aires, D., Capdevila, N., & Segundo, M. J. (2005). Ácidos grasos esenciales. *Offarm*, 24(4), 96-102.
- Angelo, P., & Neuza, G. (2007). Compuestos fenólicos en los alimentos-una breve revisión. *Revista del Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), 1-9.
- ARAMCO SERVICES CO [US]; SAUDI ARABIAN OIL CO. Consulta 2021. CARBON NEUTRALIZATION SYSTEM (CNS) FOR CO₂ SEQUESTERING. **Registro:** WO2007047805.
- Ardila-Álvarez, A., López-Matos, Y., Vásquez-Cáceres, M., González-Delgado, Á. & Barajas-Solano, A. (2017). Obtainig lipids and carbohydrates from microalgae via design of selective culture media. *TecnoLógicas*, 20, 83–94.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolitos secundarios de las plantas. *Serie Fisiológica Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Blair, M., Kokabian, B. & Gude, V. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2, 666–674.
- Céspedes, C., Marín, J., Domíngues, M., Ávila, J., & Serrano, B. (2006). Plant growth inhibitory activities by secondary. *Lead Molecules from Natural Products*, 2(1), 373-410.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., & Das, K. (2009). Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 518-532.
- Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. & Lin, C. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresour. Technol*, 99, 3389–3396.

Chun-Yen, C., Kuei-Ling, Y., Rifka, A., Duu-Jong, L. & Jo-Shu, C. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.*, 102, 71–81.

Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial biotechnology*, 8(2), 190-209.

Damian-Reyna, A. A., González-Hernández, J. C., Ayala-Zavala, J. F., Penagos, C. D. J. C., Maya-Yescas, R., & Chávez-Parga, M. D. C. (2018). Antioxidant Capacity and Food Pathogenic Bacteria Inhibition of Citrus limetta and Citrus reticulata. In Citrus-Health Benefits and Production Technology. *IntechOpen*.

De Morais, M. & Vieira, J. (2007). Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp. and Scenedesmus obliquus cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.*, 129, 439–445.

Dineshkumar, R., Narendran, R., Jayasingam, P., & Sampathkumar, P. (2017). Cultivation and chemical composition of microalgae *Chlorella vulgaris* and its antibacterial activity against human pathogens. *J Aquac Mar Biol*, 5(3), 00119.

Durán, R., & Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, 44(2), 101-106.

Estévez-Landazábal, L. L., Barajas-Solano, A. F., Barajas-Ferreira, C., & Kafarov, V. (2013). Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(2), 113-126.

Fields, F. J., Ostrand, J. T., & Mayfield, S. P. (2018). Fed-batch mixotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for high-density cultures. *Algal Research*, 33, 109-117.

El-Sheekh, M., Gheda, S., El-Sayed, A., Shady, A., El-Sheikh, M. & Schagerl, M. (2019). Outdoor cultivation of the green microalgae *Chlorella vulgaris* under stress conditions as a feedstock for biofuel. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019, 26, 18520–18532.

García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27(1), 1-12.

Gómez, A., López, J., Rodríguez, A., Fortiz, J., Martínez, L., Apolinar, A. & Enríquez, L. (2016). Production of phenolic compounds by four species of marine microalgae under different light conditions. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44, 137–143.

González-Hernández, J., Jatziry, E., Madrigal-Perez, L., Salazar-Torres, J., Valencia, R. (2018). Comparative analysis of the kinetic growth parameters and ethanol production in non-*Saccharomyces* yeasts at the bioreactor level using *Agave cupreata* juice. *Journal of Biochemical Technology*, 9(1), 1.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., & Hu, B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and bioenergy*, 35(5), 2245-2253.

Honda, R., Hamasaki, A., Miura, Y., & Hoshino, Y. (2021). Thermoresponsive CO₂ absorbent for various CO₂ concentrations: tuning the p K a of ammonium ions for effective carbon capture. *Polymer Journal*, 53(1), 157-167.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.

INHA IND PARTNERSHIP INST. Consulta 2021. Cylinder type multilayered fotobiorreactor. **Registro:** KR100945153

Kabera, J., Semana, E., Mussa, A., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(1), 377-392.

Ke, K., Pötschke, P., Wiegand, N., Krause, B., & Voit, B. (2016). Tuning the network structure in poly (vinylidene fluoride)/carbon nanotube nanocomposites using carbon black: toward improvements of conductivity and piezoresistive sensitivity. *ACS applied materials & interfaces*, 8(22), 14190-14199.

Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H., & Kang, S. N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1328-1332.

Kong, W.B., Yang, H., Cao, Y.T., Song, H., Hua, S.F. & Xia, C.G. (2013). Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. *Food Technol. Biotechnol.*, 51, 62.

Kula, M., Rys, M., Mozdzeń, K., & Skoczowski, A. (2014). Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 14(1), 57-67.

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.

Lehr, F., & Posten, C. Consulta 2021. Dispositivo de iluminación para biorreactores. **Registro:** DE202007013406U1.

Li, J., Li, C., Lan, C., & Liao, D. (2018). Effects of sodium bicarbonate on cell growth, lipid accumulation, and morphology of *Chlorella vulgaris*. *Microbial Cell Factory*, 17, 111.

Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega-Lara, A., Usma, J. S., Galvis, G., Villa-Navarro, F. A., Vásquez, L. & Ardila, C. (2005). Peces de los Andes de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá, DC Colombia.

Metsoviti, M. N., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. T., & Katsoulas, N. (2019). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, 9(1), 31.

Ochoa, L., Yong, C., Calderín, R., González, M., Miguélez, R., Vilches, E., & Díaz, H. (2011). Factores de riesgo del síndrome metabólico en la muerte súbita cardíaca. *Revista Cubana de Medicina*, 2(1), 77-86.

Olivas-Aguirre, F., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G., López-Díaz, J., Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L., & Ramos-Jimenez, A. (2015). In vitro assessment of the antimicrobial effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel decoction on saliva samples. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 55-66.

Parra, M.A., Murcia, L.J., Fernández, D.R. & Herrera, J.S. (2019). Uso de residuos agroindustriales para fabricar proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. *Av. Investig. Ing.* 2019, 16, 66–75.

Safi, C., Zebid, B., Merah, O., Pontalier, P., & Vaca-García, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2(1), 265-278.

Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.

Seyfabadi, J., & Ramezanpour, Z. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 721-726.

Shen, X.F., Qin, Q.W., Yan, S.K., Huang, J.L., Liu, K. & Zhou, S.B. (2019). Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation in autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic cultures. *J. Appl. Phycol.*, 31, 1589–1596.

Silva, N., & Palma, S. (2006). Oxígeno disuelto, pH y nutrientes en canales y fiordos australes. Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. N. Silva & S. Palma (eds.), Comité Oceanográfico Nacional-Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 37-43.

Sin nombre de solicitante. Consulta 2021. Photobioreactor having baffles integrally provided with internal light source for high density cultivation of microalgae. **Registro:** KR101043583B1.

Ursu, A., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G. & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.*, 157, 134–139.

Vilela, A., González-Paleo, L., & Revetta, D. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral*, 21(1), 317-327.

Wootton-Beard, P., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH[•], ABTS^{•+} and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224.

Yan, N., Fan, C., Chen, Y., & Hu, Z. (2016). The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 962.

Zhang, M., Gu, L., Zheng, P., Chen, Z., Dou, X., Qin, Q., & Cai, X. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory analysis*, 34(1), e23024.

Zeković, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M. M., Jakovljević, D., & Moran, C. A. (2005). Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical reviews in biotechnology*, 25(4), 205-230.

XIII. ANEXOS



Chlorella vulgaris, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review

Jesús Alberto CORONADO-REYES¹, Juan Alfonso SALAZAR-TORRES¹, Beatriz JUÁREZ-CAMPOS¹
and Juan Carlos GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ^{1*}

Abstract

Chlorella vulgaris is a microalgae belonging to the order of the *Chlorococcales*, of the *Oocytaceae* family, of the genus *Chlorella*, which has a green colour due to the chloroplasts it contains. Its shape is spherical with a size that varies from 1 to 10 microns. These microalgae contain, in addition to chlorophyll, a significant amount of intracellular proteins, carbohydrates, lipids, vitamin C, β -carotenes and B vitamins (B1, B2, B6 and B12), which is why it is commonly used for the preparation of food supplements, as well as for the production of cosmetics, clinical treatments and even for the detoxification of heavy metals in wastewater. For this reason, the following review speaks from the morphology of the microalgae *C. vulgaris* to recent investigations regarding the primary and secondary metabolites. This research also provides an overview of the areas of opportunity for the development of new products and process improvements in order to increase the existing yields so far to optimize responses based on the desired products, the formulation of various growth media or the design of new photobioreactors which allow greater control of growth conditions and easy scaling for high productions at the industrial level that cover the current global needs.

Keywords: composition, growing, metabolites, applications.

Practical application: With the analysis of the morphology of the microalgae, their metabolism, reproduction and the investigations that have been carried out regarding the primary and secondary metabolites that they produce during their growth and the abiotic factors that are important during growth it is possible to propose designs optimization of cell growth of the *C. vulgaris* species with which the yields of biomass and metabolites in crops can be increased at the photobioreactor level.

1 Introduction

The study of microalgae has become important in recent years because they are considered as raw materials for chemical compounds that have been affected by their primary and secondary metabolism, such as lipids, whose main application is for the generation of biodiesel. Among the advantages that the use of microalgae has at an industrial level, it can be identified that their cultivation is easy and fast, since they can complete their growth cycle in a few days and can develop both in salt water and freshwater in ponds, forests, and even once in fermentation tanks, have also been found to grow in wastewater (Lu et al., 2015). The *C. vulgaris* strains are species of microalgae that grow easily and quickly where, based on their metabolism, the culture medium can be autotrophic, heterotrophic, mixotrophic and photobioreactor, observing that the highest concentration of biomass is given when working in a mixotrophic medium or photobioreactor level, so it is interesting to analyze the growth of *C. vulgaris* in a mixotrophic medium using a photobioreactor. Among the applications that can be given to the metabolites produced by *C. vulgaris* is the production from the lipids that it produces as well as the synthesis of proteins and some carbohydrates (Ardila-Álvarez et al., 2017).

1.1 Morphology

C. vulgaris is a microscopic organism with a size of 2 to 10 μm and with a structure similar to that of higher plants, because it contains; a cell wall, mitochondria, and chloroplasts,

the latter being necessary to carry out photosynthesis (Safi et al., 2014).

Regarding the cell wall, it is the main defense against biotic and abiotic factors of the microalgae. At the beginning of the cell wall formation, its thickness is approximately 2 nm and as the microalgae matures, the thickness increases until it reaches a thickness of 21 nm (Yamamoto et al., 2004). As for the mitochondria, it can be mentioned that they are in charge of carrying out the metabolic processes with which the microalgae will obtain its energy, necessary to carry out all the growth and maintenance processes. The mitochondria of *C. vulgaris* are made up of double membranes, proteins and phospholipids. Finally, *C. vulgaris* only contains a single chloroplast which is composed of phospholipids and consists of two membranes where the first is permeable to certain metabolites and some ions, but the second membrane is highly selective and its function is the transport of proteins. In addition to this function, the synthesis of starch granules is possible within the chloroplast (Safi et al., 2014). Within the chloroplasts are the thylakoids where the chlorophyll is found, with which it is possible to capture energy through radiation and that it is used by the organism to create its own food. The following Figure 1 shows the *C. vulgaris* morphology.

As can be seen in Figure 1, *C. vulgaris* have a defined spherical shape and the amount of chlorophyll and pigments contained in them makes it possible to observe the living cells that keep their

Received 08 Aug., 2020

Accepted 15 Sept., 2020

¹Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico Morelia, Morelia, Michoacán, México

*Corresponding author: juan.gh@morelia.tecnm.mx

Chlorella vulgaris, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review

Jesús Alberto CORONADO-REYES¹, Juan Alfonso SALAZAR-TORRES¹, Beatriz JUÁREZ-CAMPOS¹
and Juan Carlos GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ^{1*} 

Abstract

Chlorella vulgaris is a microalgae belonging to the order of the *Chlorococcales*, of the *Oocytaceae* family, of the genus *Chlorella*, which has a green colour due to the chloroplasts it contains. Its shape is spherical with a size that varies from 1 to 10 microns. These microalgae contain, in addition to chlorophyll, a significant amount of intracellular proteins, carbohydrates, lipids, vitamin C, β -carotenes and B vitamins (B1, B2, B6 and B12), which is why it is commonly used for the preparation of food supplements, as well as for the production of cosmetics, clinical treatments and even for the detoxification of heavy metals in wastewater. For this reason, the following review speaks from the morphology of the microalgae *C. vulgaris* to recent investigations regarding the primary and secondary metabolites. This research also provides an overview of the areas of opportunity for the development of new products and process improvements in order to increase the existing yields so far to optimize responses based on the desired products, the formulation of various growth media or the design of new photobioreactors which allow greater control of growth conditions and easy scaling for high productions at the industrial level that cover the current global needs.

Keywords: composition, growing, metabolites, applications.

Practical application: With the analysis of the morphology of the microalgae, their metabolism, reproduction and the investigations that have been carried out regarding the primary and secondary metabolites that they produce during their growth and the abiotic factors that are important during growth is possible propose designs optimization of cell growth of the *C. vulgaris* species with which the yields of biomass and metabolites in crops can be increased at the photobioreactor level.

1 Introduction

The study of microalgae has become important in recent years because they are considered as raw materials for chemical compounds that have been affected by their primary and secondary metabolism, such as lipids, whose main application is for the generation of biodiesel. Among the advantages that the use of microalgae has at an industrial level, it can be identified that their cultivation is easy and fast, since they can complete their growth cycle in a few days and can develop both in salt water and freshwater in ponds, forests, and even once in fermentation tanks, have also been found to grow in wastewater (Lu et al., 2015). The *C. vulgaris* strains are species of microalgae that grow easily and quickly where, based on their metabolism, the culture medium can be autotrophic, heterotrophic, mixotrophic and photobioreactor, observing that the highest concentration of biomass is given when working in a mixotrophic medium or photobioreactor level, so it is interesting to analyze the growth of *C. vulgaris* in a mixotrophic medium using a photobioreactor. Among the applications that can be given to the metabolites produced by *C. vulgaris* is the production from the lipids that it produces as well as the synthesis of proteins and some carbohydrates (Ardila-Álvarez et al., 2017).

1.1 Morphology

C. vulgaris is a microscopic organism with a size of 2 to 10 μm and with a structure similar to that of higher plants, because it contains; a cell wall, mitochondria, and chloroplasts,

the latter being necessary to carry out photosynthesis (Safi et al., 2014).

Regarding the cell wall, it is the main defense against biotic and abiotic factors of the microalgae. At the beginning of the cell wall formation, its thickness is approximately 2 nm and as the microalgae matures, the thickness increases until it reaches a thickness of 21 nm (Yamamoto et al., 2004). As for the mitochondria, it can be mentioned that they are in charge of carrying out the metabolic processes with which the microalgae will obtain its energy, necessary to carry out all the growth and maintenance processes. The mitochondria of *C. vulgaris* are made up of double membranes, proteins and phospholipids. Finally, *C. vulgaris* only contains a single chloroplast which is composed of phospholipids and consists of two membranes where the first is permeable to certain metabolites and some ions, but the second membrane is highly selective and its function is the transport of proteins. In addition to this function, the synthesis of starch granules is possible within the chloroplast (Safi et al., 2014). Within the chloroplasts are the thylakoids where the chlorophyll is found, with which it is possible to capture energy through radiation and that it is used by the organism to create its own food. The following Figure 1 shows the *C. vulgaris* morphology.

As can be seen in Figure 1, *C. vulgaris* have a defined spherical shape and the amount of chlorophyll and pigments contained in them makes it possible to observe the living cells that keep their

Received 08 Aug., 2020

Accepted 15 Sept., 2020

¹Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico Morelia, Morelia, Michoacán, México

*Corresponding author: juan.gh@morelia.tecnm.mx

Figura 34. Portada de artículo con JCR acerca del crecimiento de la microalga *C. vulgaris* bajo condiciones fotoheterotróficas a nivel matraz.

TÍTULO DE MODELO DE UTILIDAD No. 5237

Titular(es): TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO-INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MORELIA
Domicilio: Avenida Tecnológico 1500, Col. Lomas De Santiaguito, 58120, Morelia, Michoacán, MÉXICO.
Denominación: FOTOBIOREACTOR PARA EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS.
Clasificación: CIP: C12M1/42
 CPC: C12M21/02
Inventor(es): JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ; JUAN ALFONSO SALAZAR TORRES; JESÚS ALBERTO CORONADO REYES; SERGIO HERNÁNDEZ IXTA

SOLICITUD

Número: MX/u/2021/000559	Fecha de Presentación: 13 de Octubre de 2021	Hora: 08:32
------------------------------------	--	-----------------------

Vigencia: Quince años
Fecha de Vencimiento: 13 de octubre de 2036
Fecha de Expedición: 28 de abril de 2023

El registro de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción I, 5º fracción I, 60 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 62 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, el presente registro tiene una vigencia de quince años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeto al pago de las tarifas para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso iii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS MECÁNICA, ELÉCTRICA Y DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS DE UTILIDAD

MARINA OLIMPIA CASTRO ALVEAR



Cadena Original:
 MARINA OLIMPIA CASTRO ALVEAR|0000100000510738631|SERVICIO DE ADMINISTRACION
 TRIBUTARIA|1987|MX/2023/42629|MX/u/2021/000559|Título de modelos de utilidad|1980|SRH|Pág(s)
 1|Ag+jHNeC7hQu0weRpo4nQMIE5L0=

Sello Digital:
 UhxJvFyrc7+fxhOqX2RGHxw1eQ823UWn053HuSsecQILE+TPsaD0i5sE4ZdNYQUMEIwjkH2S/ZphACZpGrSXybIA
 TiKsKO7h3Hp01crU0MeNDXYIbIleXBpPKYRjVni/g9yKc9zsCYWf9eMPKkZ7yDP3TIBWCxitIUIUZsR93RuH+DA
 FnwAAwvflU9R7OTBKjgWIFR6A9Gs2A4I2Zp4HyPn/f927ooXu/lxuUrHFHNJdDzVsPITZeAmLwkh9IKAPDddpyh
 MerM5McKIEmhYZ4mqKk8A26tGgXRZU08U+uvzR3NRomWf+1VSzhGBNMqb4b95ixN5AV+OUSQ==

Figura 35. Título de propiedad industrial para PATENTE de diseño de fotobiorreactor para crecimiento de microalgas.

Access through your institution Purchase PDF Search ScienceDirect

Chapter contents Book contents

ACADEMIC PRESS Handbook of Food and Feed from Microalgae Production, Application, Regulation, and Sustainability 2023, Pages 111-115

Chapter 10 - Vitamins from microalgae

Jesús Alberto Coronado-Reyes, Juan Carlos González-Hernández

National Technological of Mexico/Technological Institute of Morelia, Morelia, Michoacan, Mexico

Available online 23 June 2023, Version of Record 23 June 2023.

Show less

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99196-4.00026-7> Get rights and content

Abstract

Microalgae, as autotrophic organisms, need energy from light, specific temperatures, and pH in the growth medium, as well as nutrients (organic and inorganic) to survive. Nutrients are important for the final chemical composition of the microalgae. Among

Recommended articles

Food and feed from microalgae: A historical perspective to future directions
Handbook of Food and Feed from Microalgae, 2023, ...
Eduardo Jacob-Lopes, Lella Queiroz Zepka

Microalgae as a source of alternative protein
Handbook of Food and Feed from Microalgae, 2023, ...
Giorgos Markou, ..., Brijesh Tiwari

Microalgae-based ingredients and products: Toward the global sustainable...
Handbook of Food and Feed from Microalgae, 2023, ...
Mariany Costa Deprá, ..., Eduardo Jacob-Lopes

Show 3 more articles

Article Metrics

Captures

Readers: 1

Figura 36. *Citio Web donde se muestra participación como colaboración del capítulo 10 acerca de proteínas de microalgas.*

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MORELIA



Aviso de realización del acto de recepción profesional



DEPENDENCIA: SUB. ACÁDEMICA
SECCIÓN: DIV. EST. PROF.
OFICIO: D.E.P./T./2351/2022

Morelia, Mich., a **18 de noviembre de 2022**

TITULACIÓN INTEGRAL POR TESIS

C. INTEGRANTES DEL JURADO

Presidente: JUAN CARLOS GONZALEZ HERNANDEZ
Secretario: TERESA ITANDEHUI GARAMBULLO PEÑA
Vocal : JESUS ALBERTO CORONADO REYES (EXT)
Vocal Suplente: IVONE HUERTA AGUILAR
Asesor: JUAN CARLOS GONZALEZ HERNANDEZ

AT'N: MARGARITA LÓPEZ PEREA
JEFA DEL DEPTO. DE SERV. ESCOLARES

Por este medio le informo que el Acto de Recepción Profesional del (la) C. **MIRANDA VALERIA MARTÍNEZ OLGUÍN** con número de control **17120106**, egresado (a) del Instituto Tecnológico de Morelia, pasante de la carrera de **INGENIERÍA BIOQUÍMICA** se realizará el día **Viernes, 25 de noviembre de 2022**, en el horario de **08:00 A 10:00 hrs.**, en la **SALA DE TITULACIÓN 1 (EDIFICIO J) DEL CAMPUS I**.

Con trabajo denominado: **"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*"**

Se le notifica a usted que cuenta con dos días hábiles para dar aviso a su jefe de departamento cualquier inconveniente en presentarse al acto recepcional.

ATENTAMENTE  **EDUCACIÓN** | 
Excelencia en Educación Tecnológica
Técnica, Progreso de México **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MORELIA**
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

PATRICIA MOLINA VÁZQUEZ
JEFA DE LA DIV. DE EST. PROFESIONALES

c.c.p. Archivo
c.c.p. Candidato
c.c.p. Departamento académico
c.c.p. Departamento de Servicios Escolares.
PMV/mca

Figura 37. Oficio para acto recepcional de titulación en la modalidad de "Tesis" donde se participó como co-asesor.



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL PARA EL FORTALECIMIENTO
DE LA INVESTIGACIÓN Y EL POSGRADO DEL PACÍFICO**

19 de junio de 2023

M.C. Jesús Alberto Coronado Reyes
Instituto Tecnológico de Morelia
P R E S E N T E

Estimado Investigador

La Coordinación General del Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico (Programa Delfín), agradece su disposición para asesorar a estudiantes que realizarán estancias de investigación en el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico.

Con este Programa y a través de la experiencia adquirida al integrarse a los proyectos de investigación en desarrollo, pretendemos fortalecer la vocación de los jóvenes por la Ciencia y la Tecnología, y así contribuir en la formación de capital humano, para consolidar la investigación, el desarrollo y la innovación tecnológica en los países participantes.

El Programa Delfín está integrado actualmente por 277 instituciones de educación superior, de las cuales 142 son de México, 106 de Colombia, 1 de Costa Rica, 3 de Estados Unidos de Norteamérica, 6 de Nicaragua y 19 de Perú, quienes en XXVII versiones del Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, han movilizado a 70,036 estudiantes de todas las áreas del conocimiento, estimando que un gran porcentaje de los jóvenes, ya realizaron o están cursando estudios de posgrado en el país y el extranjero. Estamos convencidos que la experiencia personal y académica que Usted transmitirá a los jóvenes contribuirá de forma extraordinaria en la decisión de los estudiantes para integrarse a programas de posgrados de calidad.

Por este motivo y de manera particular, le presento a **Francisco Ariel Fajardo Sánchez**, estudiante del 5to semestre de la carrera de Ingeniería Bioquímica, de el Instituto Tecnológico de Morelia, quien realizará con su asesoría PRESENCIAL el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, en el periodo comprendido del 19 de junio al 4 de agosto de 2023.

Los estudiantes están comprometidos a trabajar de acuerdo con el programa de actividades que en conjunto definan, así como respetar las normas y políticas establecidas, y mantener una conducta ejemplar en el desempeño de las actividades académicas que les asignará.

Le recordamos, que a través de su correo electrónico recibió un usuario y contraseña para que ingrese a su sesión en nuestro sitio web www.programadelfin.org.mx, en *procesos de estancia* para confirmar el inicio, avalar

COORDINACIÓN GENERAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT / SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CIUDAD DE LA CULTURA S/N, C.P. 63000, TEPIC, NAYARIT, MÉXICO
TEL: +521-311-211-88-00 EXT. 8927 CEL: +521-311-141-94-84 E-mail: coordinacion.general@programadelfin.org.mx

Figura 38. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 1.



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL PARA EL FORTALECIMIENTO
DE LA INVESTIGACIÓN Y EL POSGRADO DEL PACÍFICO**

19 de junio de 2023

M.C. Jesús Alberto Coronado Reyes
Instituto Tecnológico de Morelia
P R E S E N T E

Estimado Investigador

La Coordinación General del Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico (Programa Delfín), agradece su disposición para asesorar a estudiantes que realizarán estancias de investigación en el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico.

Con este Programa y a través de la experiencia adquirida al integrarse a los proyectos de investigación en desarrollo, pretendemos fortalecer la vocación de los jóvenes por la Ciencia y la Tecnología, y así contribuir en la formación de capital humano, para consolidar la investigación, el desarrollo y la innovación tecnológica en los países participantes.

El Programa Delfín está integrado actualmente por 277 instituciones de educación superior, de las cuales 142 son de México, 106 de Colombia, 1 de Costa Rica, 3 de Estados Unidos de Norteamérica, 6 de Nicaragua y 19 de Perú, quienes en XXVII versiones del Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, han movilizadado a 70,036 estudiantes de todas las áreas del conocimiento, estimando que un gran porcentaje de los jóvenes, ya realizaron o están cursando estudios de posgrado en el país y el extranjero. Estamos convencidos que la experiencia personal y académica que Usted transmitirá a los jóvenes contribuirá de forma extraordinaria en la decisión de los estudiantes para integrarse a programas de posgrados de calidad.

Por este motivo y de manera particular, le presento a **Doris García Zamudio**, estudiante del 5to semestre de la carrera de Ingeniería Bioquímica, de el Instituto Tecnológico de Morelia, quien realizará con su asesoría PRESENCIAL el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, en el periodo comprendido del 19 de junio al 4 de agosto de 2023.

Los estudiantes están comprometidos a trabajar de acuerdo con el programa de actividades que en conjunto definan, así como respetar las normas y políticas establecidas, y mantener una conducta ejemplar en el desempeño de las actividades académicas que les asignará.

Le recordamos, que a través de su correo electrónico recibió un usuario y contraseña para que ingrese a su sesión en nuestro sitio web www.programadelfin.org.mx, en *procesos de estancia* para confirmar el inicio, avalar

COORDINACIÓN GENERAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT / SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CIUDAD DE LA CULTURA S/N, C.P. 63000, TEPIC, NAYARIT; MÉXICO
TEL: +521-311-211-88-00 EXT. 8927 CEL: +521-311-141-94-84 E-mail: coordinacion.general@programadelfin.org.mx

Figura 39. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 2.



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL PARA EL FORTALECIMIENTO
DE LA INVESTIGACIÓN Y EL POSGRADO DEL PACÍFICO**

19 de junio de 2023

M.C. Jesús Alberto Coronado Reyes
Instituto Tecnológico de Morelia
P R E S E N T E

Estimado Investigador

La Coordinación General del Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico (Programa Delfín), agradece su disposición para asesorar a estudiantes que realizarán estancias de investigación en el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico.

Con este Programa y a través de la experiencia adquirida al integrarse a los proyectos de investigación en desarrollo, pretendemos fortalecer la vocación de los jóvenes por la Ciencia y la Tecnología, y así contribuir en la formación de capital humano, para consolidar la investigación, el desarrollo y la innovación tecnológica en los países participantes.

El Programa Delfín está integrado actualmente por 277 instituciones de educación superior, de las cuales 142 son de México, 106 de Colombia, 1 de Costa Rica, 3 de Estados Unidos de Norteamérica, 6 de Nicaragua y 19 de Perú, quienes en XXVII versiones del Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, han movilizado a 70,036 estudiantes de todas las áreas del conocimiento, estimando que un gran porcentaje de los jóvenes, ya realizaron o están cursando estudios de posgrado en el país y el extranjero. Estamos convencidos que la experiencia personal y académica que Usted transmitirá a los jóvenes contribuirá de forma extraordinaria en la decisión de los estudiantes para integrarse a programas de posgrados de calidad.

Por este motivo y de manera particular, le presento a **Cristina Mondragón Díaz Barriga**, estudiante del 4to semestre de la carrera de Ingeniería Bioquímica, de el Instituto Tecnológico de Morelia, quien realizará con su asesoría PRESENCIAL el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, en el periodo comprendido del 19 de junio al 4 de agosto de 2023.

Los estudiantes están comprometidos a trabajar de acuerdo con el programa de actividades que en conjunto definan, así como respetar las normas y políticas establecidas, y mantener una conducta ejemplar en el desempeño de las actividades académicas que les asignará.

Le recordamos, que a través de su correo electrónico recibió un usuario y contraseña para que ingrese a su sesión en nuestro sitio web www.programadelfin.org.mx, en *procesos de estancia* para confirmar el inicio, avalar

COORDINACIÓN GENERAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT / SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CIUDAD DE LA CULTURA S/N, C.P. 63000, TEPIC, NAYARIT; MÉXICO
TEL: +521-311-211-88-00 EXT. 8927 CEL: +521-311-141-94-84 E-mail: coordinacion.general@programadelfin.org.mx

Figura 40. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 3.



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL PARA EL FORTALECIMIENTO
DE LA INVESTIGACIÓN Y EL POSGRADO DEL PACÍFICO**

19 de junio de 2023

M.C. Jesús Alberto Coronado Reyes
Instituto Tecnológico de Morelia
P R E S E N T E

Estimado Investigador

La Coordinación General del Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico (Programa Delfín), agradece su disposición para asesorar a estudiantes que realizarán estancias de investigación en el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico.

Con este Programa y a través de la experiencia adquirida al integrarse a los proyectos de investigación en desarrollo, pretendemos fortalecer la vocación de los jóvenes por la Ciencia y la Tecnología, y así contribuir en la formación de capital humano, para consolidar la investigación, el desarrollo y la innovación tecnológica en los países participantes.

El Programa Delfín está integrado actualmente por 277 instituciones de educación superior, de las cuales 142 son de México, 106 de Colombia, 1 de Costa Rica, 3 de Estados Unidos de Norteamérica, 6 de Nicaragua y 19 de Perú, quienes en XXVII versiones del Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, han movilizado a 70,036 estudiantes de todas las áreas del conocimiento, estimando que un gran porcentaje de los jóvenes, ya realizaron o están cursando estudios de posgrado en el país y el extranjero. Estamos convencidos que la experiencia personal y académica que Usted transmitirá a los jóvenes contribuirá de forma extraordinaria en la decisión de los estudiantes para integrarse a programas de posgrados de calidad.

Por este motivo y de manera particular, le presento a **María Fernanda Sandoval Sánchez**, estudiante del 4to semestre de la carrera de Ingeniería Bioquímica, de el Instituto Tecnológico de Morelia, quien realizará con su asesoría PRESENCIAL el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, en el periodo comprendido del 19 de junio al 4 de agosto de 2023.

Los estudiantes están comprometidos a trabajar de acuerdo con el programa de actividades que en conjunto definan, así como respetar las normas y políticas establecidas, y mantener una conducta ejemplar en el desempeño de las actividades académicas que les asignará.

Le recordamos, que a través de su correo electrónico recibió un usuario y contraseña para que ingrese a su sesión en nuestro sitio web www.programadelfin.org.mx, en *procesos de estancia* para confirmar el inicio, avalar

COORDINACIÓN GENERAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT / SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CIUDAD DE LA CULTURA S/N, C.P. 63000, TEPIC, NAYARIT; MÉXICO
TEL: +521-311-211-88-00 EXT. 8927 CEL: +521-311-141-94-84 E-mail: coordinacion.general@programadelfin.org.mx

Figura 41. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 4.



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL PARA EL FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y EL POSGRADO DEL PACÍFICO

19 de junio de 2023

M.C. Jesús Alberto Coronado Reyes
Instituto Tecnológico de Morelia
P R E S E N T E

Estimado Investigador

La Coordinación General del Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico (Programa Delfin), agradece su disposición para asesorar a estudiantes que realizarán estancias de investigación en el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico.

Con este Programa y a través de la experiencia adquirida al integrarse a los proyectos de investigación en desarrollo, pretendemos fortalecer la vocación de los jóvenes por la Ciencia y la Tecnología, y así contribuir en la formación de capital humano, para consolidar la investigación, el desarrollo y la innovación tecnológica en los países participantes.

El Programa Delfin está integrado actualmente por 277 instituciones de educación superior, de las cuales 142 son de México, 106 de Colombia, 1 de Costa Rica, 3 de Estados Unidos de Norteamérica, 6 de Nicaragua y 19 de Perú, quienes en XXVII versiones del Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, han movilizado a 70,036 estudiantes de todas las áreas del conocimiento, estimando que un gran porcentaje de los jóvenes, ya realizaron o están cursando estudios de posgrado en el país y el extranjero. Estamos convencidos que la experiencia personal y académica que Usted transmitirá a los jóvenes contribuirá de forma extraordinaria en la decisión de los estudiantes para integrarse a programas de posgrados de calidad.

Por este motivo y de manera particular, le presento a **Ricardo Alejandro Téllez Bazán**, estudiante del 5to semestre de la carrera de Bioquímica, de el Instituto Tecnológico de Morelia, quien realizará con su asesoría PRESENCIAL el XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, en el periodo comprendido del 19 de junio al 4 de agosto de 2023.

Los estudiantes están comprometidos a trabajar de acuerdo con el programa de actividades que en conjunto definan, así como respetar las normas y políticas establecidas, y mantener una conducta ejemplar en el desempeño de las actividades académicas que les asignará.

Le recordamos, que a través de su correo electrónico recibió un usuario y contraseña para que ingrese a su sesión en nuestro sitio web www.programadelfin.org.mx, en *procesos de estancia* para confirmar el inicio, avalar

Figura 42. Constancia de participación como asesor investigador en el programa de verano delfín 2023. Alumno 5.



Figura 43. Constancia de participación en congreso ICTI en el año 2020.



El Gobierno del Estado de Michoacán, a través del Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación, en colaboración con el Tecnológico Nacional de México, campus Instituto Tecnológico de Morelia y el respaldo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgan la presente:

CONSTANCIA

A: **JESÚS ALBERTO CORONADO-REYES, MIRANDA VALERIA MARTÍNEZ-OLGUIN, EVELYN RAMÍREZ-ACOSTA, JUAN ALFONSO SALAZAR-TORRES, JUAN CARLOS GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ; JESÚS ALBERTO CORONADO-REYES, MIRANDA VALERIA MARTÍNEZ-OLGUIN, EVELYN RAMÍREZ-ACOSTA, JUAN ALFONSO SALAZAR-TORRES, JUAN CARLOS GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ**

POR LA EXPOSICIÓN DE SU PONENCIA **CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA MICROALGA CHLORELLA VULGARIS A NIVEL MATRAZ CON GLICEROL COMO SUSTRATO** EN EL EJE 1. INVESTIGACIÓN BÁSICA DE LA MESA 3: CIENCIAS AGRÍCOLAS Y BIOTECNOLOGÍA. En el marco de las actividades académicas del



Morelia, Michoacán, a 22 de Octubre de 2021


Biol. María Piedad Trujillo García
 Directora General del Instituto de Ciencia
 Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán


Dr. José Luis Gil Vázquez
 Director del Tecnológico Nacional de México,
 campus Instituto Tecnológico de Morelia

Figura 44. Constancia de participación en congreso ICTI en el año 2021.



Gobierno de Michoacán
HONESTIDAD Y TRABAJO

El Gobierno del Estado de Michoacán, a través del Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación, en colaboración con la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, otorga la presente

CONSTANCIA

a: JESÚS ALBERTO CORONADO REYES, SALAZAR-TORRES JUAN ALFONSO; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ JUAN CARLOS

POR LA EXPOSICIÓN DE SU PONENCIA DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E INSTRUMENTACIÓN DE FOTOBIORREACTOR PARA CRECIMIENTO DE MICROALGAS EN EL EJE 1. INVESTIGACIÓN EN LAS CIENCIAS BÁSICAS DE LA MESA 2: CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

PROYECTO ASESORADO POR: SALAZAR-TORRES JUAN ALFONSO; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ JUAN CARLOS

En el marco de las actividades académicas del



y el



Morelia, Michoacán · 28 de octubre de 2022

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

DIRECTORA GENERAL

Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán

Dr. Raúl Cárdenas Navarro

RECTOR

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Figura 45. Constancia de participación en congreso ICTI en el año 2022.

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
"La Ingeniería Química,
la Sostenibilidad y la Economía Circular"

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Jesús Alberto Coronado-Reyes, Luis Alberto Madrigal-Perez, Ivone Huerta-Aguilar, Mariana Alvarez-Navarrete, Juan Carlos González-Hernández

Por la presentación del trabajo en modalidad oral:

Caracterización cinética y actividad antioxidante de *Chlorella vulgaris* en medio fotoheterotrófico a nivel matraz con glicerol como sustrato

ID: 218

XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
Puerto Vallarta, Jal., México. 23 al 26 de agosto de 2022


Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz
PRESIDENTE DE LA AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR

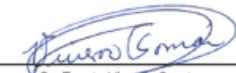

Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Figura 46. Constancia de participación en congreso AMIDIQ en el año 2022.

Instituto Tecnológico de Morelia
Subdirección Académica
Departamento de Ciencias Básicas

Morelia, Michoacán, 30/abril/2022

Asunto: Aceptación de cartel

Estimado colega:

Con relación a su trabajo titulado:

008: CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CHLORELLA VULGARIS EN MEDIO FOTOHETEROTRÓFICO A NIVEL MATRAZ PARA DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE FOTOBIOREACTOR.

Cuyos autores son:

Jesús Alberto Coronado-Reyes, Juan Alfonso Salazar-Torres, Juan Carlos González-Hernández.

Que nos envió para su consideración como posible presentación en el **16° Congreso Multidisciplinario de las Ingenierías y 2° Sesión de Carteles de Estudios Matemáticos Aplicados**, nos es grato hacerle de su conocimiento que, de acuerdo con los resultados del proceso de selección, su trabajo ha sido aceptado para su presentación en la modalidad de **CARTEL**.

Le recordamos que la presentación de los mismos se realizará el **lunes 02 de mayo del 2022 de 09:00 a 14:00 horas** en la explanada de nuestra institución, donde habrá un espacio especialmente asignado para su **CARTEL** y la fecha límite para enviarnos su trabajo es el **01 de mayo del presente año**.

A nombre del TecNM y del Instituto Tecnológico de Morelia, le agradecemos su participación y esperamos tener la oportunidad de saludarlo personalmente en el evento.

Atentamente

Comité Evaluador.



Figura 47. Carta de aceptación para participación en congreso de ciencias básicas dentro del Instituto Tecnológico de Morelia. Año 2022.

Design, Construction and Instrumentation of Photobioreactor for Microalgae Growth

Jesús Alberto Coronado-Reyes¹, Juan Alfonso Salazar-Torres², Juan Carlos González-Hernández *

¹ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Morelia.

² Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Morelia.

^{*3} Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Morelia: juan.gh@morelia.tecnm.mx

Abstract: The cultivation of microalgae has been a biotechnological technique with a large amount of throughout history has been obtained, however, it has been observed that depending on the growth conditions to which they are subjected, either by the team or by the sources of substrate and exposure to light, the yields in the production of carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, polyphenols and terpenes (primary and secondary metabolites) are increased or reduced, in addition to the fact that there is very little information on the optimization of the processes productive. That is why the present work consists of designing and implementing a photobioreactor with internal blue LED light to monitor in real time the pH, temperature, carbon dioxide (CO₂) concentration and light intensity to increase current yields. in the production of biomass and metabolites with a wide application at the biotechnological level. In the same way, with the development of this device, it is sought that it can be easily scalable at an industrial level. In conclusion, it can be mentioned that the construction of the photobioreactor was completed with an immediate response for the control of microbial growth, with which the experimentation can begin.

Background: The objective of this work is to present the design of a cylindrical photobioreactor with a concentric blue LED light source and which has sensors for monitoring temperature, pH and dissolved oxygen in real time to control the growth of microalgae under mixotrophic growth in such a way that so that optimal operational points can be found and thereby increase the current yields in the production of primary metabolites such as carbohydrates, proteins and lipids as well as secondary metabolites such as pigments (polyphenols and terpenes) whose application in biotechnology covers the food, pharmaceutical, and pharmaceutical sectors. and energetic.

Figura 48. Portada de propuesta de artículo con registro JCR sobre diseño de fotobiorreactor para crecimiento de microalgas.