



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
POSGRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**Características radiativas de la microalga  
*Coelastrella striolata*, productora de carotenoides  
durante diferentes etapas de cultivo**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA)

PRESENTA:  
I. Q. EDUARDO MARTÍNEZ NIÑO

ASESOR:  
DR. HUGO JOAQUÍN ÁVILA PAREDES

JURADO:  
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA (PRESIDENTE)  
DR. JESÚS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
(SECRETARIO)  
DRA. HEIDI ISABEL VILLAFÁN VIDALES (VOCAL)

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2023



## **Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
POSGRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**Características radiativas de la microalga  
*Coelastrella striolata*, productora de carotenoides  
durante diferentes etapas de cultivo**

### T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA)

PRESENTA:  
I. Q. EDUARDO MARTÍNEZ NIÑO

ASESOR:  
DR. HUGO JOAQUÍN ÁVILA PAREDES

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2023

## Agradecimientos

---

A mi asesor de tesis, el **Dr. Hugo J. Ávila Paredes**, por ser mi guía en este camino lleno de aprendizajes. Gracias por todos los consejos y apoyo que enriquecieron mi trabajo y sobre todo gracias por motivarme siempre a seguir adelante a pesar de las condiciones limitantes del proyecto y confiar siempre en mi trabajo. Sin duda alguna usted es una gran inspiración para seguir mi formación profesional como investigador.

A mis sinodales de examen de grado a la **Dra. Heidi Isabel Villafán Vidales** y a los **Doctores Carlos Omar Castillo Araiza y Gerardo Saucedo Castañeda**, por sus comentarios, observaciones y discusiones que sin duda alguna enriquecieron este trabajo.

A mi madre, **Adriana Maricela Niño Gil**, quien jamás me dejó solo en este largo y difícil proceso y que siempre me demostró su apoyo y amor incondicional; gracias por formarme con valores y buenos sentimientos que me ayudaron a levantarme y vencer varios obstáculos. A mi padre, **Celso Martínez Carmona**; quien me enseñó que con trabajo y esfuerzo se pueden alcanzar tus metas.

A mis hermanas, **Adriana Verenice Martínez Niño y Karen Martínez Niño**, quienes siempre me recordaron lo valioso que soy y porque me animaron a seguir adelante en los momentos difíciles de este trayecto, gracias por siempre sacarme una sonrisa y por estar conmigo compartiendo este nuevo logro.

A mi mejor amiga, **Jessica Torres Cervantes**, por ser mi soporte incondicional cuando me sentía solo, perdido y desesperado; gracias por estar conmigo en esta nueva etapa, por darme ánimos y hacer más amena mi vida.

A mis amigos del Laboratorio LAESS, **Luis Ángel Castillo Cruz, Jocelyn Carmona Ascencio, Dulce Rosario Domínguez Tiburcio y Luis Ángel Olivares Rodríguez**, gracias por su amistad y apoyo, por los conocimientos, pláticas, risas y momentos compartidos.

A mis amigos y colegas de generación, **Aurora Monserrat Hernández Orozco, Laura Adriana Guerrero Gudiño y Amaay de Jesús Epitacio García** por su amistad y apoyo en esta travesía que a pesar de la distancia debido a la pandemia siempre tratamos de estar juntos para superar los momentos de crisis.

A los **Dres. Juan José Cabello Robles** y **Patricio Javier Valadés Pelayo** por la asesoría técnica, comentarios y sugerencias recibidas a lo largo del desarrollo del presente proyecto.

Al grupo de investigación del **Dr. Guadalupe Ramos** por el asesoramiento y uso de Espectrofotómetro IR.

Finalmente, quiero agradecer al **Posgrado en Ingeniería Química** y a la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa** por acogerme durante la realización de estudios de maestría; así como al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada (CVU- 1078384) para la realización de mis estudios de maestría.

## Resumen

---

La producción de carotenoides a partir de microalgas depende de varios factores nutrimentales, ambientales y de la configuración del fotobiorreactor. Generalmente, la síntesis y acumulación de estos pigmentos en las células suele inducirse mediante la modificación de las condiciones de cultivo como altas intensidades luminosas, limitación de nutrientes especialmente nitrógeno y fósforo, altas temperaturas y adición de sales al medio de cultivo. Sin embargo, estas condiciones de estrés pueden afectar negativamente el crecimiento de microalgas y puede reducir el rendimiento de estos metabolitos. Para contrarrestar este efecto negativo, se ha planteado la estrategia de cultivo en dos etapas, en la primera bajo condiciones adecuadas de cultivo se logra maximizar la cantidad de biomasa y la segunda etapa está reservada para inducir la producción de carotenoides mediante la alteración de alguna condición de cultivo.

Lo anteriormente descrito ha conducido al desarrollo de sistemas de cultivo como los fotobiorreactores (FBRs) que son sistemas cerrados y se pueden controlar distintas condiciones de cultivo. Sin embargo, uno de los factores fundamentales dentro de estos cultivos es la luz y la consecuente síntesis de metabolitos de interés, por ello es necesario realizar un análisis de los fenómenos de transferencia de luz y su distribución dentro de los sistemas de cultivo, siendo la ecuación de transferencia radiativa (Radiative Transfer Equation, RTE) el modelo que describe estos fenómenos. La RTE contiene 3 parámetros esenciales (características radiativas): el coeficiente de extinción ( $\beta_\lambda$ ), albedo ( $\omega_\lambda$ ) y función de fase ( $\Phi_\lambda$ ), cuya estimación es necesaria para resolver la RTE.

En el presente proyecto se presentan las características radiativas de la microalga *Coelastrella striolata* que está emergiendo como una cepa prometedora en la producción de carotenoides. La determinación de estos parámetros se realizó a un cultivo en conservación (etapa estacionaria), a través del crecimiento y en condiciones para promover la carotenogénesis (síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides). Se encontró que, en etapa estacionaria  $\bar{\beta}^*$  es independiente de la concentración de biomasa,  $\beta_\lambda^*$  es independiente de la longitud de onda; mientras que  $\omega_\lambda$  es dependiente de la longitud de onda debido a la presencia de pigmentos como clorofilas y carotenoides.

Por otro lado, durante el crecimiento  $\bar{\beta}^*$  y  $\omega_\lambda$  fue incrementando a medida que la microalga alcanzaba el estado estacionario, esto se atribuyó a que las concentraciones de pigmentos disminuyeron, por lo tanto, el sistema fotosintético o las células se vuelven menos eficientes para la absorción de energía y por ende el fenómeno de dispersión domina sobre la absorción. En condiciones para promover la carotenogénesis, la presencia de  $\text{MgCl}_2$  redujo el tiempo de formación de carotenoides totales en comparación con el cultivo control y con  $\text{NaCl}$ , esto debido a que los cationes divalentes como el  $\text{Mg}^{2+}$  estimula la actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides. Es por ello, que los cambios en las características radiativas son más notables en los cultivos con  $\text{MgCl}_2$ ; por ejemplo,  $\beta_\lambda^*$  va aumentando con el transcurso del tiempo debido a una mayor interacción de la luz con los pigmentos formados en las células. Además, una vez formados los carotenoides en las células  $\omega_\lambda$  tiende a ser mayor a 0.5, ya que estos actúan como fotoprotectores y disipan el exceso de energía para evitar un daño al aparato fotosintético. Entonces la composición bioquímica de la biomasa como la presencia de pigmentos si afecta las características radiativas debido a su función dual como fotoprotectores y absorbedores de luz.

Finalmente se demostró que el parámetro de asimetría (g) de la función fase ( $\Phi_\lambda$ ) es independiente de las etapas de cultivo y tomó un valor de 0.9 lo que indica una dispersión de energía hacia enfrente que concuerda con lo reportado con la literatura. Los resultados obtenidos sobre características radiativas en diferentes etapas de cultivo, tienen el potencial para ser utilizados en procesos de monitoreo y análisis en tiempo real de los fenómenos radiativos en FBRs.

# Contenido

---

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	3
2.1	Pigmentos carotenoides .....	3
2.1.1	Aplicaciones comerciales de carotenoides .....	4
2.1.2	Mercado de carotenoides.....	5
2.1.3	Microalgas productoras de pigmentos carotenoides.....	7
2.2	Etapas de crecimiento en el cultivo por lotes de microalgas .....	8
2.2.1	Etapa de adaptación o retraso (lag) .....	8
2.2.2	Etapa exponencial.....	10
2.2.3	Etapa lineal.....	10
2.2.4	Etapa decreciente.....	10
2.2.5	Etapa estacionaria .....	11
2.2.6	Etapa de muerte .....	11
2.3	Producción de pigmentos carotenoides .....	11
2.3.1	Etapa verde.....	12
2.3.2	Etapa roja .....	12
2.4	Ecuación de transferencia radiativa para microorganismos en suspensión ...	15
2.5	Características radiativas de microalgas.....	17
2.5.1	Determinación experimental de características radiativas.....	17
3	JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	26
4	HIPOTÉISIS Y OBJETIVOS .....	27
4.1	Hipótesis .....	27
4.2	Objetivos.....	27
4.2.1	Objetivo general.....	27
4.2.2	Objetivos específicos .....	27
5	METODOLOGÍA.....	28
5.1	Selección de la microalga de estudio.....	28

5.2	Conservación y mantenimiento de la cepa .....	29
5.3	Determinación de curvas de crecimiento .....	30
5.3.1	Determinación de concentración de biomasa mediante peso seco.....	31
5.3.2	Determinación de concentración de biomasa mediante conteo celular ..	31
5.3.3	Análisis de cultivo por microscopía óptica.....	32
5.4	Determinación de concentraciones de nutrientes.....	32
5.5	Identificación y cuantificación de pigmentos .....	33
5.6	Inducción de estrés celular para promover carotenogénesis .....	34
5.7	Análisis de extractos por espectroscopía infrarroja .....	35
5.8	Determinación de características radiativas .....	36
5.8.1	Coefficiente de extinción ( $\beta_{\lambda}^*$ ) .....	36
5.8.2	Albedo promedio y espectral a partir del porcentaje de energía dispersada ( $\phi$ ) .....	37
5.8.3	Parámetro de asimetría (g) de la función fase ( $\Phi$ ) .....	38
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
6.1	Cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> en etapa verde .....	40
6.1.1	Curva de crecimiento de <i>Coelastrella striolata</i> .....	40
6.1.2	Micrografías ópticas del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> .....	43
6.1.3	Consumo de nutrientes por <i>Coelastrella striolata</i> .....	44
6.1.4	Identificación de pigmentos en extractos.....	46
6.2	Características radiativas de <i>Coelastrella striolata</i> en suspensión en etapa estacionaria .....	48
6.2.1	Coefficiente de extinción específico promedio .....	48
6.2.2	Coefficiente de extinción específico espectral.....	49
6.2.3	Albedo espectral.....	51
6.2.4	Porcentaje de energía dispersada .....	52
6.3	Características radiativas de <i>Coelastrella striolata</i> en suspensión en diferentes etapas de crecimiento.....	53
6.3.1	Coefficiente de extinción promedio .....	53
6.3.2	Coefficiente de extinción espectral.....	55

6.3.3	Albedo espectral.....	56
6.3.4	Porcentaje de energía dispersada.....	58
6.4	Cultivo de <i>Coelastrrella striolata</i> en condiciones para promover la carotenogénesis (etapa roja) .....	60
6.4.1	Evolución de la concentración de biomasa .....	60
6.4.2	Micrografías ópticas.....	61
6.4.3	Identificación de pigmentos en extractos.....	64
6.5	Características radiativas de <i>Coelastrrella striolata</i> en suspensión en condiciones para promover la carotenogénesis.....	78
6.5.1	Coefficiente de extinción específico espectral.....	78
6.5.2	Albedo espectral.....	81
6.5.3	Porcentaje de energía dispersada.....	84
7	CONCLUSIONES .....	86
8	PERSPECTIVAS.....	88
9	REFERENCIAS.....	90
10	ANEXOS.....	98
10.1	Anexo I. Espectro de absorción de la microalga <i>Coelastrrella striolata</i> en suspensión .....	98
10.2	Anexo II. Curva patrón de concentración de biomasa de la microalga <i>Coelastrrella striolata</i> en medio Bayfolan® Forte.....	99
10.3	Anexo III. Método de Monte Carlo Ray Tracing (MCRT).....	100
10.4	Anexo IV. Caracterización de la fuente de luz LED .....	102
10.5	Anexo V. Coeficiente de absorción específico in vivo en [m <sup>2</sup> /g] de pigmentos. ....	103
10.6	Anexo VI. Histogramas de distribución de tamaño de células .....	104
10.6.1	Cultivo control.....	104
10.6.2	Cultivos con NaCl.....	105
10.6.3	Cultivos con MgCl <sub>2</sub> .....	108
10.7	Anexo VII. Espectros infrarrojos (IR) obtenidos de la literatura para distintos pigmentos .....	111

## Índice de figuras

---

Figura 1. Estructura molecular de los carotenoides. a) Carotenos ( $\beta$ -caroteno), b) Xantofilas (astaxantina).....	3
Figura 2. Prospectiva global del mercado de carotenoides en el 2024 de acuerdo con Industry Experts.....	7
Figura 3. Contenido de carotenoides en distintas fuentes naturales. Adaptado de [1].....	8
Figura 4. Etapas de crecimiento en cultivo por lotes de microalgas (línea continua) y concentración de nutrientes (línea discontinua) [22, 23]. .....	10
Figura 5. Efectos del estrés nutricional y ambiental típico sobre la producción de carotenoides en microalgas, y las estrategias de cultivo en dos etapas. Adaptado de [5]. .....	13
Figura 6. Balance de energía radiativa en un elemento diferencial de volumen. Adaptado de [31]. .....	15
Figura 7. Diferentes configuraciones experimentales para la determinación de características radiativas. Adaptado de [33]. .....	19
Figura 8. Esfera integradora que permite la medición de: a) transmitancia hemisférica direccional y b) reflectancia hemisférica direccional. Adaptado de [33]. .....	19
Figura 9. Configuración para medir la dispersión y la absorción con una esfera integradora [34]. .....	20
Figura 10. Representación esquemática del sistema experimental para determinación de características radiativas. Tomado de [35]. .....	21
Figura 11. Micrografía óptica de células de <i>Coelastrella striolata</i> a un objetivo de 40X. ....	28
Figura 12. Representación esquemática del sistema de aireación para la determinación de las curvas de crecimiento. ....	30
Figura 13. Configuración experimental para la inducción de estrés celular de <i>Coelastrella striolata</i> . .....	35
Figura 14. Sistema experimental para la determinación del albedo ( $\omega_\lambda$ ) y parámetro de asimetría (g) del cultivo de microalgas. Tomado de [35]. ...	37
Figura 15. Representación esquemática del fenómeno de dispersión lateral a diferentes ángulos provocado por la interacción de fotones con microalgas (vista superior del sistema esférico). Tomado de [35]. .....	38
Figura 16. Diagrama de bloques de la metodología para estimar características radiativas de microalgas en suspensión. Adaptado de [35].	39

Figura 17. Curva de crecimiento de <i>Coelastrella striolata</i> en medio Bayfolan® Forte. ....	40
Figura 18. Ajuste de datos experimentales a modelos primarios. a) Modelo de Gompertz y b) Modelo logístico. ....	42
Figura 19. Micrografías ópticas (40X) de células de <i>Coelastrella striolata</i> a lo largo de su crecimiento (por triplicado). a) 5 días, b) 25 días y c) 30 días. ....	43
Figura 20. Concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo en función del tiempo. ....	44
Figura 21. Concentración de clorofilas y carotenoides totales extraídos del día 5 al día 30 de cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> . ....	46
Figura 22. Coeficiente de extinción específico promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) de las microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 y <i>Coelastrella striolata</i> a diferentes concentraciones de biomasa. ....	49
Figura 23. Coeficiente específico de extinción espectral ( $\beta_\lambda^*$ ) de las microalgas <i>Coelastrella striolata</i> (presente estudio), <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 [35] y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 [7] en suspensión. ....	50
Figura 24. Albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de las microalgas <i>Coelastrella striolata</i> (presente estudio), <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 [35] y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 [7] en suspensión. ....	51
Figura 25. Porcentaje de energía dispersada por el cultivo microalgal de <i>Coelastrella striolata</i> en función de la posición angular a diferentes valores de g. ....	53
Figura 26. Coeficiente de extinción específico promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> en función del tiempo. ....	55
Figura 27. Coeficiente de extinción específico ( $\beta_\lambda^*$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> a lo largo de su crecimiento. ....	56
Figura 28. Albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> en suspensión en diferentes etapas de crecimiento. ....	57
Figura 29. Albedo en función del tiempo para clorofila a (436 nm) y carotenoides totales (485 nm) para la microalga <i>Coelastrella striolata</i> . ....	58
Figura 30. Porcentaje de energía dispersada por el cultivo microalgal de <i>Coelastrella striolata</i> en diferentes etapas de crecimiento en función de la posición angular a diferentes valores de g. a) Día 0 (Adaptación) , b) Día 5 (Exponencial), c) Día 10 (Exponencial) y d) Día 25 (Estacionaria). ....	59
Figura 31. Concentración de biomasa en función del tiempo a diferentes concentraciones de cloruro. (●) NaCl, (■)MgCl <sub>2</sub> . ....	60

Figura 32. Micrografías ópticas (40X) del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> en función del tiempo y con diferentes concentraciones de cloruros. Control: a), NaCl: b) 0.086 [Cl <sup>-</sup> ] M, c) 0.173 [Cl <sup>-</sup> ] M, d) 0.260 [Cl <sup>-</sup> ] M y MgCl <sub>2</sub> : e) 0.086 [Cl <sup>-</sup> ] M, f) 0.173 [Cl <sup>-</sup> ] M, g) 0.260 [Cl <sup>-</sup> ] M.....	62
Figura 33. Tamaño de células en función del tiempo a diferentes concentraciones de cloruros. (●) NaCl, (■)MgCl <sub>2</sub> . .....	63
Figura 34. Concentraciones de pigmentos extraídos en <i>Coelastrella striolata</i> cultivada con NaCl. (●) 0, (●) 0.086, (●) 0.173 y (●) 0.260 [Cl <sup>-</sup> ] M.....	64
Figura 35. Concentraciones de pigmentos extraídos en <i>Coelastrella striolata</i> cultivada con MgCl <sub>2</sub> . (●) 0, (●) 0.086, (●) 0.173 y (●) 0.260 [Cl <sup>-</sup> ] M.....	67
Figura 36. Ruta de biosíntesis de carotenoides en clorófitas [18, 59, 60]..	68
Figura 37. Cantidades másicas relativas de pigmentos. a) NaCl, b) MgCl <sub>2</sub> . .....	71
Figura 38. Evolución del color de cultivos de <i>Coelastrella striolata</i> a través del tiempo.....	72
Figura 39. Espectros IR de extractos de pigmentos de <i>Coelastrella striolata</i> cultivada sin cloruros. ....	75
Figura 40. Espectros IR de extractos de pigmentos de <i>Coelastrella striolata</i> cultivada con NaCl.....	76
Figura 41. Espectros IR de extractos de pigmentos de <i>Coelastrella striolata</i> cultivada con MgCl <sub>2</sub> .....	77
Figura 42. Coeficiente de extinción específico espectral ( $\beta_{\lambda}^*$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> cultivada sin cloruros.....	78
Figura 43. Coeficiente de extinción específico espectral ( $\beta_{\lambda}^*$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> cultivada con cloruros. a) y b) NaCl, c) y d) MgCl <sub>2</sub> . .....	80
Figura 44. Albedo espectral ( $\omega_{\lambda}$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> cultivada sin la presencia de cloruros.....	82
Figura 45. Albedo espectral ( $\omega_{\lambda}$ ) de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> cultivada con cloruros. a) y b) NaCl, c) y d) MgCl <sub>2</sub> .....	83
Figura 46. Porcentaje de energía dispersada por el cultivo microalgal de <i>Coelastrella striolata</i> sin cloruros en función de la posición angular a diferentes valores de g. a) Día 0, b) Día 5, c) Día 10 y d) Día 15. ....	84
Figura 47. Espectro de absorción en la región PAR (400-700 nm) para la microalga <i>Coelastrella striolata</i> en suspensión. ....	98
Figura 48. Curva patrón de concentración de biomasa y densidad celular de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> en medio Bayfolan® Forte .....	99

Figura 49. Diagrama de bloques del método MCRT para resolver la ecuación de transferencia radiativa dentro del montaje experimental (recipiente esférico). Adaptado de [35].	101
Figura 50. Espectro de emisión de la fuente de luz LED utilizada en la determinación de características radiativas.	102
Figura 51. Coeficiente de absorción específico in vivo en [m <sup>2</sup> /g] de pigmentos [69].	103
Figura 52. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> sin cloruros (Control).	104
Figura 53. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> con 0.086 [Cl <sup>-</sup> ] M.	105
Figura 54. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> con 0.173 [Cl <sup>-</sup> ] M.	106
Figura 55. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> con 0.260 [Cl <sup>-</sup> ] M.	107
Figura 56. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> con 0.086 [Cl <sup>-</sup> ] M.	108
Figura 57. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> con 0.173 [Cl <sup>-</sup> ] M.	109
Figura 58. Histogramas de distribución de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> con 0.260 [Cl <sup>-</sup> ] M.	110
Figura 59. Espectro IR de clorofila a. Tomado de [66].	111
Figura 60. Espectro IR de clorofila b. Tomado de [67].	111
Figura 61. Espectro IR de astaxantina y β-caroteno. Tomado de [68].	112
Figura 62. Espectro IR de cantaxantina y β-caroteno. Tomada de [70].	112

## Índice de tablas

---

Tabla 1. Rol biológico de los carotenoides y beneficios en la salud humana [14, 16].....	4
Tabla 2. Carotenoides y sus campos de aplicación [2, 15, 16]. .....	6
Tabla 3. Carotenoides derivados de microalgas [2, 20, 24].....	9
Tabla 4. Condiciones de cultivo en dos etapas para la síntesis de carotenoides [26–29]. .....	14
Tabla 5. Composición del fertilizante Bayfolan® Forte. ....	29
Tabla 6. Condiciones de cultivo para la determinación de las curvas de crecimiento de <i>Coelastrella striolata</i> . .....	31
Tabla 7. Técnicas utilizadas para la medición de nutrientes en el fotómetro multiparamétrico HI 83203. ....	32
Tabla 8. Condiciones de cultivo para la etapa de estrés celular de <i>Coelastrella striolata</i> . .....	34
Tabla 9. Parámetros de ajuste para modelos primarios.....	42
Tabla 10. Tamaño promedio de células del cultivo de <i>Coelastrella striolata</i> . .....	44
Tabla 11. Cantidades másicas relativas de pigmentos en células de <i>Coelastrella striolata</i> a través del tiempo.....	47
Tabla 12. Coeficiente de extinción específico promedio de la microalga <i>Coelastrella striolata</i> en diferentes etapas de crecimiento.....	54
Tabla 13. Bandas características para pigmentos.....	74

## Nomenclatura

---

FBR	Fotobiorreactor
RTE	Radiative Transfer Equation: ecuación de transferencia radiativa
ROS	Reactive Oxygen Species: especies reactivas de oxígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
TSCS	Two-Stage Cultivation Strategies: estrategia de cultivo en dos etapas
N	Nitrógeno
P	Fósforo
IL	Intensidad luminosa [ $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ]
T	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]
S	Salinidad
$I_{\lambda}$	Intensidad de radiación espectral [ $\text{W}/\text{m}^2 \text{ sr nm}$ ]
s	Distancia entre dos zonas o dos puntos de una superficie confinada [m]
I	Intensidad de radiación transmitida sin microalgas [ $\text{W}/\text{m}^2$ ]
$I_0$	Intensidad de radiación transmitida con microalgas [ $\text{W}/\text{m}^2$ ]
$C_b$	Concentración de biomasa [g/L]
l	Distancia que recorren los fotones desde la superficie externa del sistema a la posición bajo consideración [m]
$E_T$	Energía transmitida [W]
$E_D^T$	Energía dispersada total [W]
$E_{in}$	Energía de entrada al sistema [W]
$g_{\lambda}$	Parámetro de asimetría de la función fase
VIS	Visible
NIR	Near InfraRed: infrarrojo cercano
PAR	Photosynthetically Active Radiation: radiación fotosintéticamente activa
K	Potasio
PTFE	Politetrafluoroetileno
$c_a$	Concentración de clorofila a [mg/g de biomasa seca]
$c_b$	Concentración de clorofila b [mg/g de biomasa seca]
$c_{x+c}$	Concentración de carotenoides totales [mg/g de biomasa seca]
x	Xantofilas
c	Carotenos
M	Molaridad [mol/L]
% p/p	Porcentaje Peso a Peso
IR	Infrarrojo

MCRT	Monte Carlo Ray Tracing
t	Tiempo [días]
$C_{b_{\text{máx}}}$	Concentración de biomasa máxima [g/L]
$C_{b_0}$	Concentración de biomasa inicial [g/L]
$C_b(t)$	Concentración de biomasa al tiempo t [g/L]
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
$CO_2$	Dióxido de carbono
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

### Letras griegas

$\kappa_\lambda$	Coeficiente de absorción espectral [1/m]
$\sigma_{s\lambda}$	Coeficiente de dispersión espectral [1/m]
$\beta_\lambda$	Coeficiente de extinción espectral [1/m]
$\beta_\lambda^*$	Coeficiente de extinción específico espectral [m <sup>2</sup> /g]
$\bar{\beta}^*$	Coeficiente de extinción específico promedio [m <sup>2</sup> /g]
$\omega_\lambda$	Albedo espectral [-]
$\lambda$	Longitud de onda [nm]
$\pi$	Constante pi [-]
$\Omega$	Ángulo sólido [sr]
$\Phi_\lambda$	Función fase de dispersión [1/sr]
$\tau_\lambda$	Espesor óptico [-]
$\phi$	Porcentaje de energía dispersada [-]
$\theta$	Ángulo entre la dirección de radiación incidente y dispersada en un punto (°)
$\mu_s$	Coseno del ángulo de dispersión
$\mu$	Tasa de crecimiento específica aparente [día <sup>-1</sup> ]

## Capítulo 1

# 1 INTRODUCCIÓN

---

Los pigmentos carotenoides tienen una variedad de aplicaciones a nivel industrial y para consumo humano, sin embargo, la mayoría de estos son producidos vía sintética y podrían contener trazas tóxicas lo que genera una desconfianza e incertidumbre en el consumidor. Es por ello que esto ha impulsado la obtención de estos pigmentos a través de fuentes de materia naturales, una opción prometedora es a partir del cultivo de microalgas, ya que ofrecen ventajas de costo, escala, tiempo y rendimiento sobre las fuentes naturales como frutos, flores y vegetales que convencionalmente se emplean para la extracción de carotenoides [1].

Los pigmentos carotenoides con mayor demanda en el mercado son la astaxantina y el  $\beta$ -caroteno con el 34 y 29 % del mercado total, respectivamente [2, 3]. Para la obtención de astaxantina comúnmente se utiliza la microalga *Haematococcus pluvialis*, mientras que para  $\beta$ -caroteno se utiliza la microalga *Dunaliella salina*, ya que se ha encontrado que son de las especies con mayor contenido de estos pigmentos. Sin embargo, en los últimos años las microalgas del género *Coelastrella* están emergiendo como fuentes prometedoras para la obtención de ambos pigmentos [4].

Generalmente la producción de pigmentos carotenoides consta de dos etapas de cultivo, la primera etapa consiste en maximizar la cantidad de biomasa (conocida como etapa verde) que se logra mediante condiciones favorables de crecimiento como suficiencia de fuentes de nitrógeno y fósforo, bajas intensidades luminosas, temperaturas no mayores a 30°C y la segunda etapa consiste en alterar alguna condición del cultivo para inducir la síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides (conocida como etapa roja) que se logra bajo deficiencia de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo, altas intensidades luminosas e incremento de la salinidad del medio [5]. Aunado a esto se ha encontrado que modificar la salinidad en el medio es más barato en comparación con el aumento de temperatura o intensidad luminosa.

Lo anterior ha impulsado al desarrollo de fotobiorreactores (FBRs) para el cultivo de microalgas en las condiciones arriba descritas, pero una de las limitantes en su diseño es que la distribución de la luz generalmente no es homogénea y, por lo tanto, debe realizarse un análisis de transferencia radiativa dentro del reactor, la cual es descrita por la ecuación de transferencia radiativa (Radiative Transfer Equation, RTE) [6].

Esta última es un balance de energía radiativa que viaja en una dirección particular y en la que se consideran los fenómenos de dispersión y absorción. Es por ello que los coeficientes de absorción y dispersión de las microalgas junto con la función fase son parámetros importantes y necesarios para resolver y simular la RTE en fotobiorreactores. La mayoría de estos parámetros dependen de las condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento y cepa de la microalga de estudio. Sin embargo, general o frecuentemente solo se determinan en una etapa específica y no a lo largo del crecimiento [7–10]. Esto podría afectar en los modelos que describen el crecimiento de estos microorganismos, ya que a lo largo del crecimiento se desencadenan procesos fisiológicos a nivel metabólico que impactan en las características radiativas [6, 11–13].

El presente proyecto tiene como objetivo determinar las características radiativas de un cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento y en condiciones de estrés para determinar la relación de éstas con la presencia de pigmentos carotenoides. El correcto análisis de estos parámetros contribuirá a mejorar el diseño, escalamiento, y control del cultivo de microalgas en fotobiorreactores para la producción de pigmentos carotenoides.

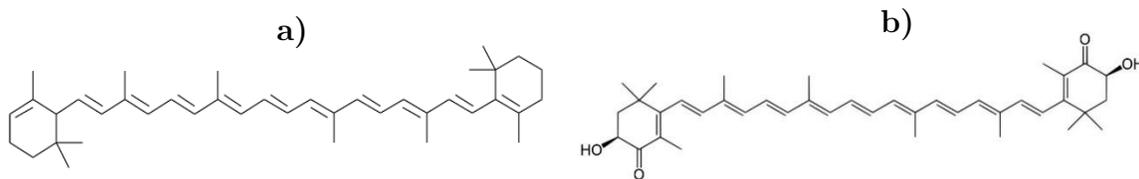
## Capítulo 2

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son pigmentos derivados de los tetraterpernos, que son compuestos que constan de 8 unidades de isopreno (C5) que comprenden una estructura de polienos de 40 carbonos. Son solubles en grasa, absorben la luz dentro de una longitud de onda de 400-550 nm y son la fuente del color amarillo, naranja y rojo de muchas frutas y verduras y de algunas microalgas [14].

Los carotenoides pueden clasificarse por su estructura química o funcionalidad. Basada en la estructura química los carotenoides se clasifican en dos tipos: (1) carotenos, que existen como hidrocarburos puros, es decir, están constituidos de carbono e hidrógeno como, por ejemplo, el  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno y (2) xantofilas, que además de estar constituidos por carbono e hidrógeno contienen oxígeno como en el caso de la luteína, zeaxantina, astaxantina y fucoxantina. La estructura de estos compuestos puede verse en la Figura 1.



**Figura 1. Estructura molecular de los carotenoides. a) Carotenos ( $\beta$ -caroteno), b) Xantofilas (astaxantina).**

Con base en la funcionalidad, los carotenoides se pueden clasificar como primarios y secundarios. Los primeros se conocen como pigmentos fotosintéticos y juegan un papel clave en la fotosíntesis, mientras que los segundos son los que se producen a través de la carotenogénesis solo cuando las células están expuestas a condiciones ambientales como alta salinidad, deficiencia de nutrientes, alta intensidad luminosa entre otras [15].

Las funciones importantes de los pigmentos carotenoides durante la fotosíntesis, incluyen la captación de luz y la fotoprotección del aparato fotosintético. Mientras que, como pigmentos accesorios, en condiciones de poca luz, los carotenoides recolectan la luz disponible y transfieren la energía a las moléculas de clorofila. Mientras que,

durante la exposición a alta intensidad luminosa, ocurre lo contrario, los carotenoides admiten el exceso de energía de la clorofila y la disipan, protegiéndola del fotodaño [14].

Los pigmentos carotenoides protegen las células apagando los estados de triplete de clorofila y estabilizando físicamente la membrana. Además, debido a su capacidad antioxidante pueden neutralizar los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS). Estas últimas se encargan de dañar las moléculas principales del cuerpo, incluido el ADN, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos y cuando estos se dañan causan disfunción o alteración de varios genes de respuesta al estrés, lo que inicia la formación adicional de ROS. Lo anteriormente descrito permite que los pigmentos carotenoides tengan aplicaciones comerciales para el consumo humano como se puede ver en la Tabla 1 [16].

**Tabla 1. Rol biológico de los carotenoides y beneficios en la salud humana [14, 16].**

<b>Papel de los carotenoides en las células</b>	<b>Beneficios en la salud humana</b>
Estabilización de la membrana	Menor riesgo de inflamación
Disipación de energía	Menor riesgo de enfermedades cardíacas
Captación de luz y fotoprotección	Prevención del cáncer
Antioxidantes activos	Mejora en salud ocular
Reducción de ROS	Protección de neuronas y menor riesgo de diabetes tipo II

### 2.1.1 Aplicaciones comerciales de carotenoides

Las principales aplicaciones de los carotenoides son actualmente como complementos dietéticos, alimentos fortificados, colorantes alimentarios, alimentación animal y productos farmacéuticos y cosméticos. Además de aportar color a algunos alimentos (lo que aumenta la percepción de calidad de los consumidores), los carotenoides son poderosos antioxidantes y se utilizan como agentes de conservación para retardar el proceso de oxidación, lo que reduce la degradación de los alimentos y el desarrollo de sabores desagradables [16].

En cosmética, los carotenoides se utilizan como principios activos con actividad biológica en cremas y lociones. Se utilizan por sus propiedades antioxidantes y valor nutricional para la piel y el cabello, ya que los carotenoides brindan fotoprotección de la piel contra la luz ultravioleta.

El sector de salud y nutracéuticos de los carotenoides es el mercado de mayor crecimiento de la industria. Esto es debido a la amplia gama de enfermedades humanas existentes, incluidas las degenerativas y las cuales se producen por la generación de radicales libres, estrés oxidativo y desequilibrio redox celular. Como se mencionó anteriormente los carotenoides sirven como antioxidantes, por lo tanto, esto permite que se neutralicen los radicales libres y de esa forma prevenir enfermedades crónicas, daño celular y envejecimiento. En la salud también se ha demostrado que los carotenoides reducen el riesgo de inflamación, enfermedades cardíacas y cáncer, diabetes tipo 2, enfermedades oculares y obesidad, Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica [2, 16]. En la Tabla 2 se muestran de manera general las aplicaciones de los carotenoides.

### **2.1.2 Mercado de carotenoides**

Actualmente la mayoría de los carotenoides son producidos de forma sintética, debido a que se utiliza una mano de obra y productos químicos de bajo costo, lo que elimina la necesidad de la presencia de un microorganismo y los costos posteriores de cosecha y extracción. Sin embargo, aunque este tipo de carotenoides son más rápidos y baratos de producir, son menos efectivos en términos de sus propiedades promotoras de la salud y, por lo tanto, son menos valiosos y deseables como producto [14].

La situación descrita anteriormente ha estimulado la obtención de productos naturales y es por ello que se prevé que el mercado de carotenoides crezca de \$1500 millones de dólares en 2020 a \$2000 millones de dólares en 2026 [2, 3]. Un estudio realizado por Markets and Markets en 2020, pronostica que el valor de mercado de los carotenoides evolucionaría a una tasa de crecimiento anual compuesta del 4.2 % de 2019 a 2026. De acuerdo con la Figura 2, la demanda de astaxantina,  $\beta$ -caroteno y luteína han adquirido una fuerte demanda en el mercado global de carotenoides y ésta seguirá creciendo en el futuro [2, 3].

La astaxantina es consumida por la industria de alimentos para salmón y de acuerdo con Markets and Markets se estima que para el año 2026 alcance los 965.8 millones de dólares; mientras que para  $\beta$ -caroteno se estima que alcance los 780 millones de dólares para el año 2027. Los precios de mercado de los carotenoides pueden variar de 300 a 3000 dólares por kg de  $\beta$ -caroteno y de 2500 a 10000 dólares por kg de astaxantina [17].

Tabla 2. Carotenoides y sus campos de aplicación [2, 15, 16].

Carotenoide	Tipo de carotenoide	Aplicaciones
$\beta$ -caroteno	Caroteno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de vitamina A</li> <li>• Antioxidante</li> <li>• Aditivo alimenticio</li> <li>• Prevención de cáncer de piel y de mama</li> <li>• Estimula la comunicación celular y la mejora del sistema inmunológico</li> <li>• Fotoprotección de la piel frente a la luz ultravioleta</li> </ul>
Astaxantina	Xantofila	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioxidante</li> <li>• Aditivo alimenticio</li> <li>• Propiedades antiinflamatorias</li> <li>• Previene el daño oxidativo de la piel (cremas de protección solar UV)</li> <li>• Prevención del cáncer</li> <li>• Prevención de la degeneración macular asociada a la edad</li> <li>• Producción de anticuerpos</li> <li>• Prevención de la degeneración macular asociada a la edad</li> </ul>
Licopeno	Caroteno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioxidante</li> <li>• Reduce significativamente el riesgo de cánceres, incluidos los de mama, hígado, cuello uterino, próstata y ovario</li> <li>• Prevención de enfermedades cardiovasculares</li> <li>• Previene el daño oxidativo de la piel (protección contra radiación UV)</li> </ul>
Luteína y Zeaxantina	Xantofilas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prevención de cataratas</li> <li>• Prevención de la degeneración macular asociada a la edad</li> <li>• Ayuda a mantener una función visual normal</li> </ul>

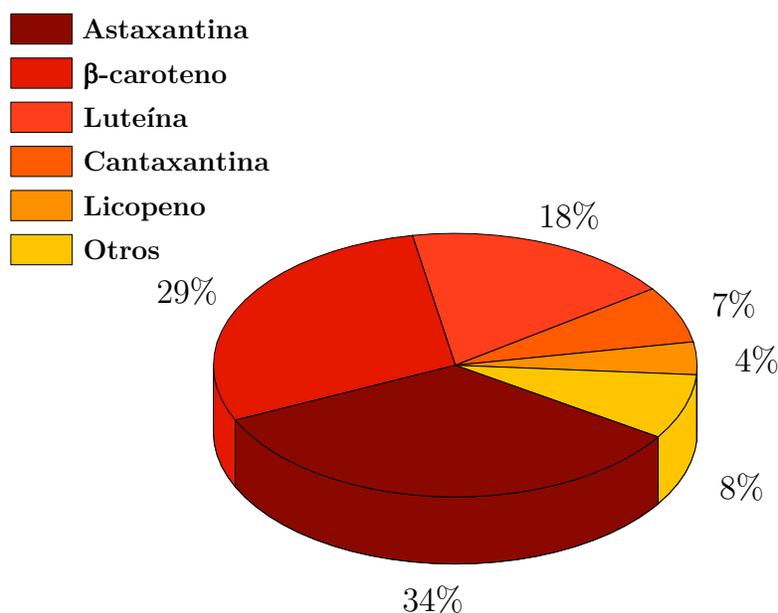


Figura 2. Prospectiva global del mercado de carotenoides en el 2024 de acuerdo con Industry Experts.

### 2.1.3 Microalgas productoras de pigmentos carotenoides

Los pigmentos carotenoides de origen natural de fuentes microbianas como hongos, bacterias y algas se han explotado para aplicaciones comerciales. Sin embargo, los pigmentos carotenoides como la astaxantina, el  $\beta$ -caroteno y la luteína de las algas han recibido mucha más atención, ya que se ha demostrado que tienen un uso potencial en el sector de nutracéuticos, productos farmacéuticos, alimentos, piensos para animales, complementos dietéticos y cosméticos [2].

Las microalgas han sido estudiadas como una fuente natural y sostenible para la obtención de carotenoides, ya que ofrecen ventajas de costo, escala, tiempo y rendimiento sobre las fuentes naturales que convencionalmente se emplean para la extracción de carotenoides [1, 2, 14, 16]. En la Figura 3 se muestra un gráfico comparativo del contenido de pigmentos carotenoides en algunas fuentes naturales como frutos, flores, vegetales y especies de microalgas.

La Figura 3 muestra que las especies de microalgas suelen tener un mayor contenido de carotenoides en comparación con otras fuentes naturales. La acumulación de pigmentos carotenoides en microalgas depende de cada especie o cepa de microalga y del conjunto de condiciones operativas para su cultivo como lo son el medio de cultivo, la temperatura, el pH, la aireación, la agitación y la irradiación [18–20].

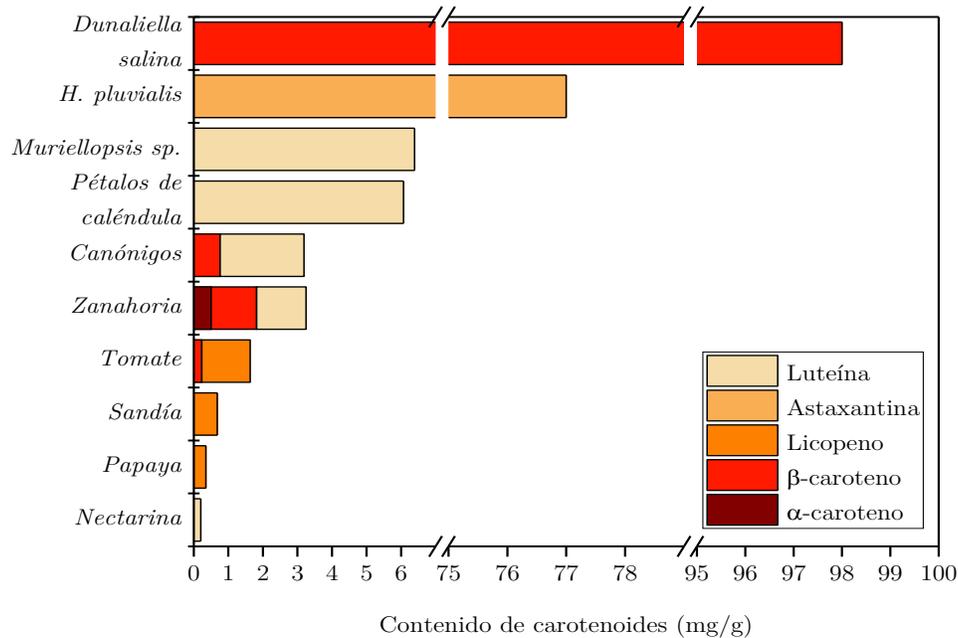


Figura 3. Contenido de carotenoides en distintas fuentes naturales. Adaptado de [1].

En la Tabla 3 se muestra el contenido de carotenoides en diferentes especies de microalgas [19–21].

## 2.2 Etapas de crecimiento en el cultivo por lotes de microalgas

El cultivo por lotes o Batch se refiere al cultivo de microalgas en un reactor con una carga inicial de medio de cultivo que no se altera por otro nutriente adicional o eliminación. Este sistema de cultivo es uno de los más simples, por lo que ha sido ampliamente utilizado tanto en laboratorio como con fines industriales. La Figura 4 muestra las etapas típicas de crecimiento del cultivo inoculado en un sistema de cultivo por lotes, la cual consta de 6 etapas: *adaptación o retraso (lag)*, *exponencial*, *lineal*, *decreciente*, *estacionaria* y *muerte* [22, 23].

### 2.2.1 Etapa de adaptación o retraso (lag)

La fase de retraso es un periodo de adaptación, en las que las células se están ajustando fisiológicamente a sus nuevas condiciones. El retraso en el crecimiento se atribuye a la adaptación fisiológica del metabolismo celular al crecimiento, como el aumento de los niveles de enzimas y metabolitos involucrados en la división celular y la fijación de carbono [22].

Tabla 3. Carotenoides derivados de microalgas [2, 20, 24].

Carotenoide	Microalga	Contenido (mg/g)
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>	21-98
	<i>Chromochloris zofingiensis</i>	13.81
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	1.7-6.8
	<i>Coelastrrella striolata</i>	1.5
	<i>Coelastrrella sp.</i>	0.67-1.8
$\beta$ -caroteno	<i>Dunaliella salina</i>	37-90
	<i>Chromochloris zofingiensis</i>	7.18
	<i>Chlorella citrifforme</i>	1.1
	<i>Coelastrrella striolata</i>	7.0
	<i>Coelastrrella sp.</i>	0.14-1.4
Luteína	<i>Chromochloris zofingiensis</i>	13.81
	<i>Chlorella vulgaris</i>	9.82
	<i>Scenedesmus sp.</i>	7.47
	<i>Chlorella sp.</i>	8.9
Cantaxantina	<i>Coelastrrella striolata</i>	3.2
	<i>Coelastrrella sp.</i>	47.5
Zeaxantina	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0.2-0.3
	<i>Coelastrrella sp.</i>	13.15
	<i>Chromochloris zofingiensis</i>	7.00

La duración de esta etapa puede variar considerablemente, en función de cuán diferentes sean las condiciones de las condiciones de las que proceden las células, así como del estado de las propias células. Las células en crecimiento activo transferidas de un tipo de medio al mismo tipo de medio, con las mismas condiciones ambientales, tendrán el período de retraso más breve. Las células dañadas tendrán un largo período de retraso, ya que deben repararse antes de poder reproducirse [23].

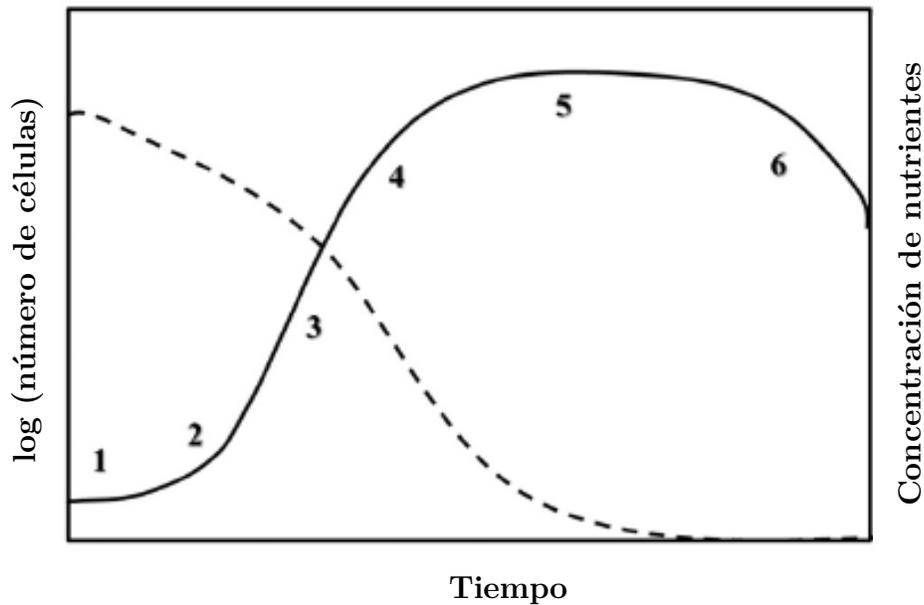


Figura 4. Etapas de crecimiento en cultivo por lotes de microalgas (línea continua) y concentración de nutrientes (línea discontinua) [22, 23].

### 2.2.2 Etapa exponencial

Una vez que las células han acumulado todo lo que necesitan para crecer, las células crecen y se dividen como una función exponencial del tiempo. Esto debido a que existen las condiciones adecuadas para un crecimiento muy rápido, mientras que condiciones menos ideales darían como resultado un crecimiento más lento. Durante este periodo, la intensidad de luz y los nutrientes no limitan el crecimiento de las microalgas, además de que las células son las más sanas y uniformes, lo que explica por qué la mayoría de los experimentos utilizan células en esta etapa [22].

### 2.2.3 Etapa lineal

En la fase de crecimiento lineal, la división celular de las microalgas se ralentiza porque la luz se vuelve limitante, por lo que la biomasa de microalgas se acumula a un ritmo constante hasta que los nutrientes o los inhibidores en el medio de cultivo se convierten en los factores limitantes [22].

### 2.2.4 Etapa decreciente

La fase de crecimiento decreciente se caracteriza por la reducción de la tasa de división celular debido a factores limitantes, como nutrientes, dióxido de carbono y otros [22].

### 2.2.5 Etapa estacionaria

En la fase estacionaria, algunas células continúan dividiéndose, pero otras comienzan a morir a la misma velocidad, por lo que la curva se aplana. La tasa de crecimiento llega entonces a cero en la fase estacionaria porque se agotan los nutrientes en el medio de cultivo. En esta etapa se acumulan los productos de almacenamiento de carbono, como el almidón y los lípidos neutros [22].

### 2.2.6 Etapa de muerte

Finalmente, en la etapa de muerte, la tasa de mortalidad supera la natalidad de las células y por esta razón la curva sufre un declive. La concentración de células de microalgas disminuye rápidamente en la fase de muerte, también llamada fase de choque, debido al agotamiento de los nutrientes, el sobrecalentamiento, la alteración del pH o la contaminación [22].

Es importante mencionar que cada curva de crecimiento es específica para cada cepa de microalga y condiciones de cultivo.

## 2.3 Producción de pigmentos carotenoides

La síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides en microalgas puede incrementarse mediante la introducción de estrés ambiental como altas intensidades luminosas, limitación de nutrientes especialmente nitrógeno y fósforo, altas temperaturas y adición de sales al medio de cultivo [5, 18, 24]. Sin embargo, estas condiciones de estrés pueden afectar negativamente el crecimiento de microalgas y causar daño oxidativo a las células, lo que eventualmente puede reducir el rendimiento de los productos deseados [5].

Para superar estas limitaciones entre el crecimiento celular y la producción de moléculas valiosas (pigmentos carotenoides), se ha tomado como medida general la estrategia de cultivo en dos etapas (Two-Stage Cultivation Strategies, TSCS). La primera etapa del cultivo, también conocida como *etapa verde* se le proporcionan las condiciones óptimas al microorganismo para maximizar la producción de biomasa, mientras que la segunda etapa o *etapa roja* se reserva para la acumulación de carotenoides bajo condiciones de estrés [5, 23, 25].

### 2.3.1 Etapa verde

En la primera etapa para mejorar la productividad de la biomasa se enfatiza la producción fotoautotrófica de células vegetativas en condiciones de crecimiento óptimas como bajas intensidades luminosas, altas concentraciones de nitrógeno (N) y fosforo (P), temperaturas  $< 30$  °C y baja salinidad en el medio [25]. Los productores comerciales como Cyanotech Corporation (productor de astaxantina) cultiva sus microalgas en FBRs, ya que se obtienen mayores productividades de biomasa en comparación con los sistemas abiertos debido a que se puede tener un mayor control de las condiciones de cultivo.

### 2.3.2 Etapa roja

Una vez que se produce la biomasa necesaria, en la segunda etapa se proporcionan condiciones de estrés como alta irradiancia, alta temperatura, agotamiento de nutrientes o aumento de la salinidad [23, 25]. El estrés implica la interrupción de la homeostasis como resultado de la aplicación de un factor estresante. Las respuestas al estrés son los cambios en el metabolismo celular a medida que las células se aclimatan e intentan restaurar la homeostasis [26]. En la Figura 5 se resume las estrategias de un cultivo en dos etapas para la producción de carotenoides.

En los últimos años se han realizado varios estudios de los factores estimulantes ambientales y de cultivo que pueden aumentar el rendimiento y la acumulación de carotenoides en microalgas. Cabe resaltar que éstas dependen de cada cepa de microalga. En la Tabla 4 se muestran algunos resultados obtenidos en diferentes estudios, para diferentes microalgas y condiciones de cultivo.

Aunque la producción de carotenoides podría verse impulsada por varios factores ambientales de estrés abiótico como se puede observar en la Figura 5 y Tabla 4, el tratamiento de estrés salino es mucho más atractivo porque es barato, fácil de operar y tiene un gran valor de comercialización para el cultivo de microalgas en agua de mar ( $\sim 3.5$  %) [24].

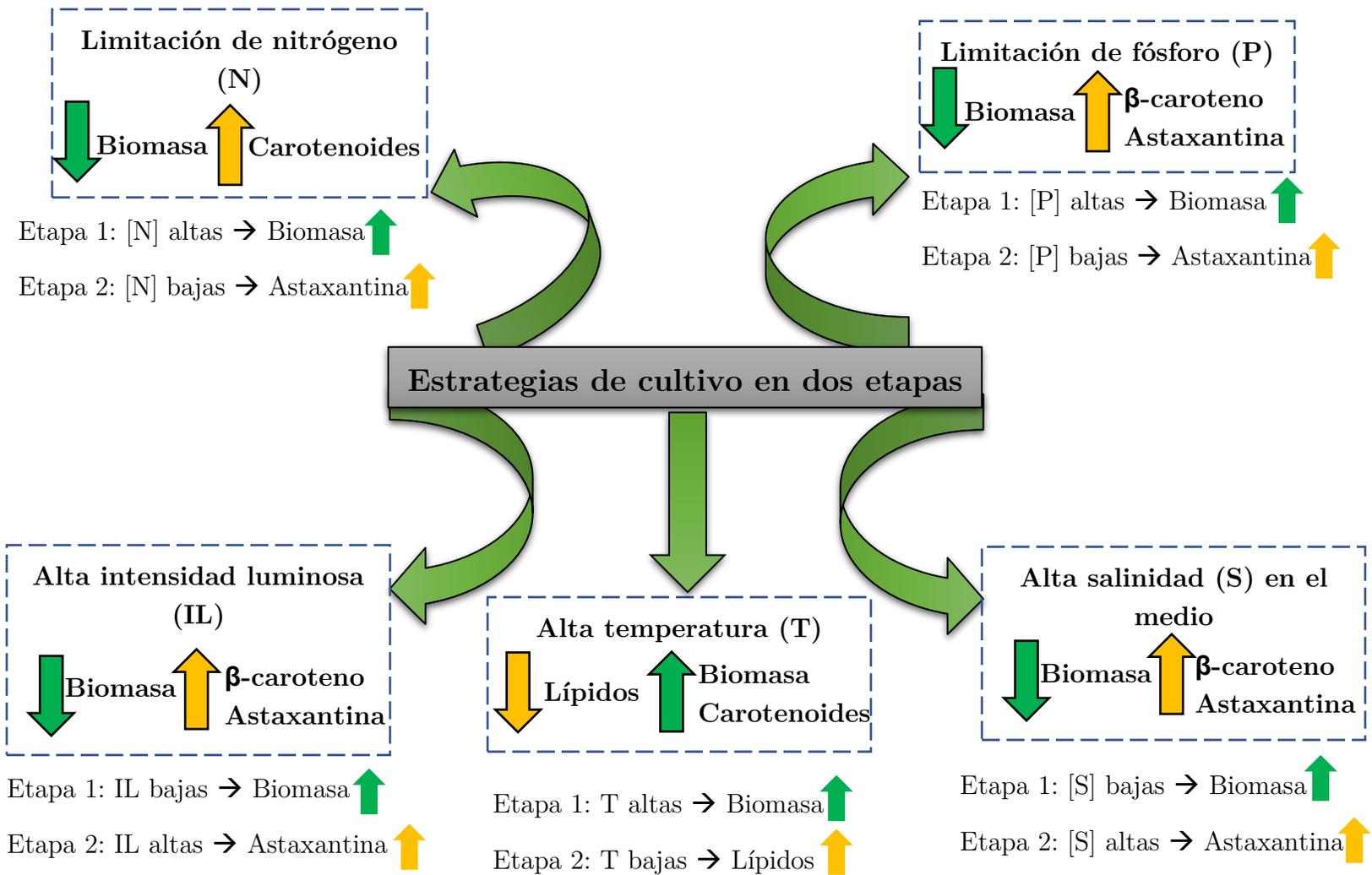


Figura 5. Efectos del estrés nutricional y ambiental típico sobre la producción de carotenoides en microalgas, y las estrategias de cultivo en dos etapas. Adaptado de [5].

Las cepas más estudiadas para la producción de pigmentos carotenoides, especialmente para astaxantina y  $\beta$ -caroteno son *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina*, respectivamente [19]. Sin embargo, diversos estudios han comenzado la detección de nuevas algas carotenogénicas adecuadas para el desarrollo comercial con el fin de aumentar el panel de posibilidades para obtener mejores productividades de pigmentos carotenoides o rendimientos de extracción. En ese sentido, otras dos algas verdes clorofíceas, *Chromochloris zofingiensis* y *Coelastrella sp.*, están emergiendo como especies prometedoras de estudio [4].

*Características radiativas de la microalga Coelastrrella striolata, productora de carotenoides durante diferentes etapas de cultivo*

Tabla 4. Condiciones de cultivo en dos etapas para la síntesis de carotenoides [26–29].

Microalga	Etapa verde			Etapa roja		
	Condiciones de cultivo	Productividad de biomasa (g/L·día)	Concentración de pigmentos (mg/g de biomasa seca)	Condiciones de cultivo	Productividad de biomasa (g/L·día)	Concentración de pigmentos (mg/g de biomasa seca)
<i>Coelastrrella striolata</i> var. <i>multistriata</i>	Medio de cultivo Bold Basal T = 25 °C IL continua = 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ pH = 8.0 FBR = Botella de vidrio plana con burbujeo Tiempo de cultivo = 30 días	0.083	Clorofila a = 18.3 Clorofila b = 6.0 $\beta$ -caroteno = 5.2 Astaxantina = NR Cantaxantina = 3.2	Medio de cultivo Bold Basal T = 25 °C IL continua = 65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ pH = 8.0 FBR = Botella de vidrio plana Tiempo de cultivo = 30 días	0.093	Clorofila a = 0.3 Clorofila b = 0.3 $\beta$ -caroteno = 7.0 Astaxantina = 1.5 Cantaxantina = 47.5
<i>Coelastrrella</i> sp. <i>KGU-H001</i>	Medio de cultivo Bold Basal T = 25 °C IL continua = 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ pH = 8.0 FBR = Matraz de 100 mL Agitación de 120 rpm Tiempo de cultivo = 21 días	NR	$\beta$ -caroteno = 0.27 Astaxantina = 0.01 Cantaxantina = 0.44	Medio de cultivo Bold Basal T = 25 °C IL continua = 214 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ pH = 8.0 FBR = Matraz de 100 mL Agitación de 120 rpm Tiempo de cultivo = 21 días	NR	$\beta$ -caroteno = 0.14 Astaxantina = 0.67 Cantaxantina = 0.44
<i>Coelastrrella</i> sp. <i>F50</i>	Medio de cultivo Bold 3N T = 32 °C IL continua = 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ FBR = Botella de 250 mL con burbujeo Tiempo de cultivo = 12 días 0 % p/p NaCl	0.2	NR	Medio de cultivo Bold 3N T = 32 °C IL continua = 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ FBR = Botella de 250 mL con burbujeo Tiempo de cultivo = 7 días 1.5 % NaCl	0.13	$\beta$ -caroteno = 1.4 Astaxantina = 1.8 Cantaxantina = 0.18
<i>Chlorella vulgaris</i>	Medio de cultivo BG-11 T = 25 °C IL continua = 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ FBR = Botella de 1 L con burbujeo Tiempo de cultivo = 15 días	0.067	Clorofila a = 3.25 Carotenoides totales = 1	Medio de cultivo BG-11 T = 25 °C IL continua = 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ FBR = Botella de 1 L con burbujeo Tiempo de cultivo = 20 días	0.052	Clorofila a = 2 Carotenoides totales = 1.9
<i>Chlorella vulgaris</i>	Medio de cultivo BG-11 T = 25 °C IL continua = 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ FBR = Botella de 1 L con burbujeo Tiempo de cultivo = 15 días 5 g/L NaCl	0.035	Clorofila a = 2 Carotenoides totales = 1.25	Medio de cultivo BG-11 T = 25 °C IL continua = 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ FBR = Botella de 1 L con burbujeo Tiempo de cultivo = 15 días 10 g/L NaCl	0.029	Clorofila a = 0.6 Carotenoides totales = 2.2

## 2.4 Ecuación de transferencia radiativa para microorganismos en suspensión

El crecimiento de las microalgas está determinado por la tasa de fotosíntesis y ésta es función de la intensidad de radiación a la que están expuestas las células. Sin embargo, los modelos que describen esta relación consideran que la intensidad de radiación que recibe el cultivo microalgal es constante o es un promedio de toda la intensidad incidente, lo que puede llevar a un error en la estimación en el campo de radiación en los diversos sistemas de cultivo, ya sean abiertos o cerrados (mejor conocidos como fotobiorreactores (FBRs)) [30].

Por ello es necesario comprender los distintos fenómenos de transporte radiativos como son la absorción, dispersión, transmisión y atenuación que ocurren dentro de estos sistemas, para poder describir el campo de radiación.

La intensidad de radiación en medios absorbentes, dispersantes y no emisores como son las suspensiones de microorganismos en FBRs, se rige por la ecuación de transferencia radiativa (Radiative Transfer Equation, RTE). La RTE se puede derivar considerando un pequeño elemento de volumen del cultivo y realizando un balance de energía radiativa que viaja en dirección  $\hat{s}$ , considerando las contribuciones de la energía radiativa por absorción y dispersión como se muestra en la Figura 6. Además, para este análisis radiativo se suele suponer que la forma de las microalgas (partículas) son esféricas, que el medio es homogéneo y que tiene un índice de refracción uniforme (es decir, el haz de luz se propaga a través de líneas rectas) [31].

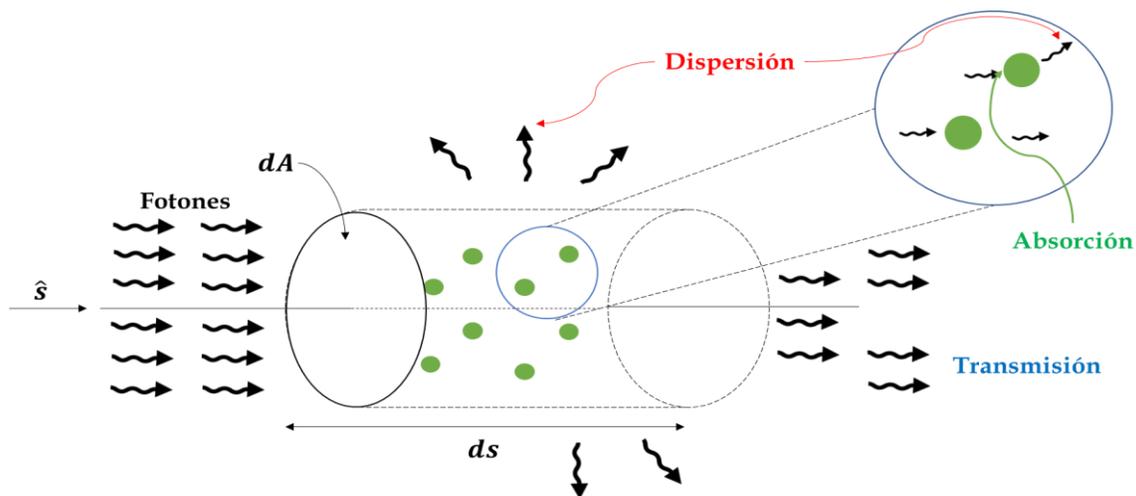


Figura 6. Balance de energía radiativa en un elemento diferencial de volumen. Adaptado de [31].

Lo descrito anteriormente se puede representar mediante la siguiente ecuación integro-diferencial:

$$\frac{\partial I_\lambda}{\partial s} = -\kappa_\lambda I_\lambda - \sigma_{s\lambda} I_\lambda + \frac{\sigma_{s\lambda}}{4\pi} \int_0^{4\pi} I_\lambda(\hat{s}_i) \Phi_\lambda(\hat{s}_i, \hat{s}) d\Omega_i \quad (2.1)$$

Donde  $I_\lambda$  es la intensidad de radiación espectral en la dirección  $\hat{s}$  en  $\text{W}/\text{m}^2 \text{ nm sr}$ , el primer término del lado derecho de la ecuación (2.1) corresponde a la atenuación del rayo incidente por absorción mientras viaja a través del medio, mientras que el segundo término corresponde a la atenuación por dispersión, o “out-scattering” (alejándose de la dirección considerada) y se refiere a que una parte de la intensidad entrante se elimina de la dirección de propagación  $\hat{s}$ . Estos dos primeros términos contienen un signo negativo, que indica la disminución de la intensidad de radiación (pérdida de energía). La única diferencia entre los dos fenómenos es que la energía absorbida se convierte en energía interna, mientras que la energía dispersada simplemente se redirige y aparece como aumento en otra dirección [31]. El tercer término del lado derecho de la ecuación (2.1) es el aumento de intensidad de radiación debido a la dispersión (in-scattering); considera las contribuciones de todas las direcciones y, por lo tanto, debe calcularse mediante la integración sobre todos los ángulos sólidos ( $\Omega$ ). La función  $\Phi_\lambda$  se conoce como función fase de dispersión y describe la probabilidad de que un rayo de una dirección  $\hat{s}_i$  pudiera dispersarse en una cierta dirección  $\hat{s}$  [31]. El término del lado izquierdo de la ecuación (2.1) es el cambio de intensidad de radiación respecto a la posición.

Reacomodando la ecuación (2.1):

$$\frac{\partial I_\lambda}{\partial s} = -(\kappa_\lambda + \sigma_{s\lambda}) I_\lambda + \frac{\sigma_{s\lambda}}{4\pi} \int_0^{4\pi} I_\lambda(\hat{s}_i) \Phi_\lambda(\hat{s}_i, \hat{s}) d\Omega_i \quad (2.2)$$

Donde  $\kappa_\lambda$  y  $\sigma_{s\lambda}$  son los coeficientes de absorción y dispersión espectrales, respectivamente; y la suma de ambos coeficientes proporcionan la atenuación total de la intensidad entrante, esto también se conoce como extinción. Por lo que se puede definir un coeficiente de extinción:

$$\beta_\lambda = \kappa_\lambda + \sigma_{s\lambda} \quad (2.3)$$

Por lo tanto, la ecuación 2.2 se transforma en la ecuación (2.4).

$$\frac{\partial I_\lambda}{\partial s} = -\beta_\lambda I_\lambda + \frac{\sigma_{s\lambda}}{4\pi} \int_0^{4\pi} I_\lambda(\hat{s}_i) \Phi_\lambda(\hat{s}_i, \hat{s}) d\Omega_i \quad (2.4)$$

Si dividimos la ecuación (2.4) entre el coeficiente de extinción espectral se obtiene la ecuación (2.5).

$$\frac{dI_\lambda}{d\tau_\lambda} = -I_\lambda + \frac{\omega_\lambda}{4\pi} \int_0^{4\pi} I_\lambda(\hat{s}_i) \Phi_\lambda(\hat{s}_i, \hat{s}) d\Omega_i \quad (2.5)$$

Donde  $\tau_\lambda$  es el espesor óptico,  $\omega_\lambda$  es el albedo de dispersión simple, parámetro que representa la fracción de luz dispersada, es decir, es el cociente del coeficiente de dispersión  $\sigma_{s\lambda}$  entre el coeficiente de extinción  $\beta_\lambda$ , como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\omega_\lambda = \frac{\sigma_{s\lambda}}{\kappa_\lambda + \sigma_{s\lambda}} = \frac{\sigma_{s\lambda}}{\beta_\lambda} \quad (2.6)$$

Es importante notar que para la solución de la RTE dada por las ecuaciones (2.2) e (2.5), los valores coeficientes de absorción ( $\kappa_\lambda$ ), dispersión ( $\sigma_{s\lambda}$ ) y la función fase ( $\Phi_\lambda$ ) son parámetros esenciales [31].

## 2.5 Características radiativas de microalgas

Las características radiativas (o propiedades ópticas) son necesarias para realizar un análisis cuidadoso de la transferencia de radiación, como se abordó en la sección 2.4, para diseñar, optimizar y controlar la distribución del campo de luz en los FBRs y hacerlos más eficientes [6, 13]. Sin embargo, estas características son específicas de cada cepa de microalga, etapa de crecimiento y de las condiciones de cultivo, debido a las variaciones en la composición de la biomasa (lípidos, pigmentos, etc.) [13]. Los estudios para la determinación de estos parámetros en diferentes etapas de crecimiento y condiciones de cultivo son relativamente bajos [6, 11–13, 32], por lo que no hay una base de datos disponible que proporcione esta información, incluso para las cepas de microalgas que se cultivan a nivel industrial.

### 2.5.1 Determinación experimental de características radiativas

Las características radiativas de las microalgas han sido medidas experimentalmente o predichas teóricamente. La estimación teórica proporciona una mejor comprensión de la influencia de la morfología y las constantes ópticas de las partículas y propiedades radiativas del medio. Por lo tanto, abre caminos hacia el diseño de nuevos materiales con propiedades personalizadas.

Por el contrario, la estimación experimental proporciona el conocimiento de las propiedades reales de las partículas. La identificación también puede usarse como un medio para verificar la validez de la elección del modelo de predicción de propiedades de las partículas. Sin embargo, debido al número de parámetros involucrados, la estimación de las características radiativas probablemente se encuentre entre los procesos de identificación más complicados [33].

En cuanto a la estimación experimental de las características radiativas es un enfoque escalonado que requiere elecciones adecuadas de:

- I. Un modelo directo de transferencia radiativa y un modelo de solución relacionado, por ejemplo, RTE resuelto por un método numérico u otro método del mismo nivel de sofisticación, o ecuaciones más simples como ecuación de transporte que pueda resolverse por métodos semi-analíticos.
- II. Una configuración experimental (abordado más adelante).
- III. Un conjunto de parámetros a identificar / predecir teóricamente y de una secuencia operativa.
- IV. Un método de optimización.

Las técnicas experimentales disponibles para la identificación de las características radiativas consisten en mediciones espectrales y direccionales de reflectancia y/o transmitancia. Las configuraciones experimentales que se pueden utilizar se representan esquemáticamente en la Figura 7 [33].

De acuerdo con el esquema de la Figura 7:

- a) El haz colimado incide casi normalmente en la muestra. Se llevan a cabo mediciones bidireccionales de transmitancia y reflectancia.
- b) Se tiene el haz colimado con diferentes ángulos de incidencia sobre la muestra. Se llevan a cabo mediciones de transmitancia y reflectancia hemisférica y también es posible para una sola dirección de incidencia casi normal.
- c) Se tiene radiación difusa sobre la muestra. Se llevan a cabo medidas de transmitancia y reflectancia bidireccional.
- d) Mediciones de flujo de radiación bidireccional emitido por una muestra caliente (autoemisión).

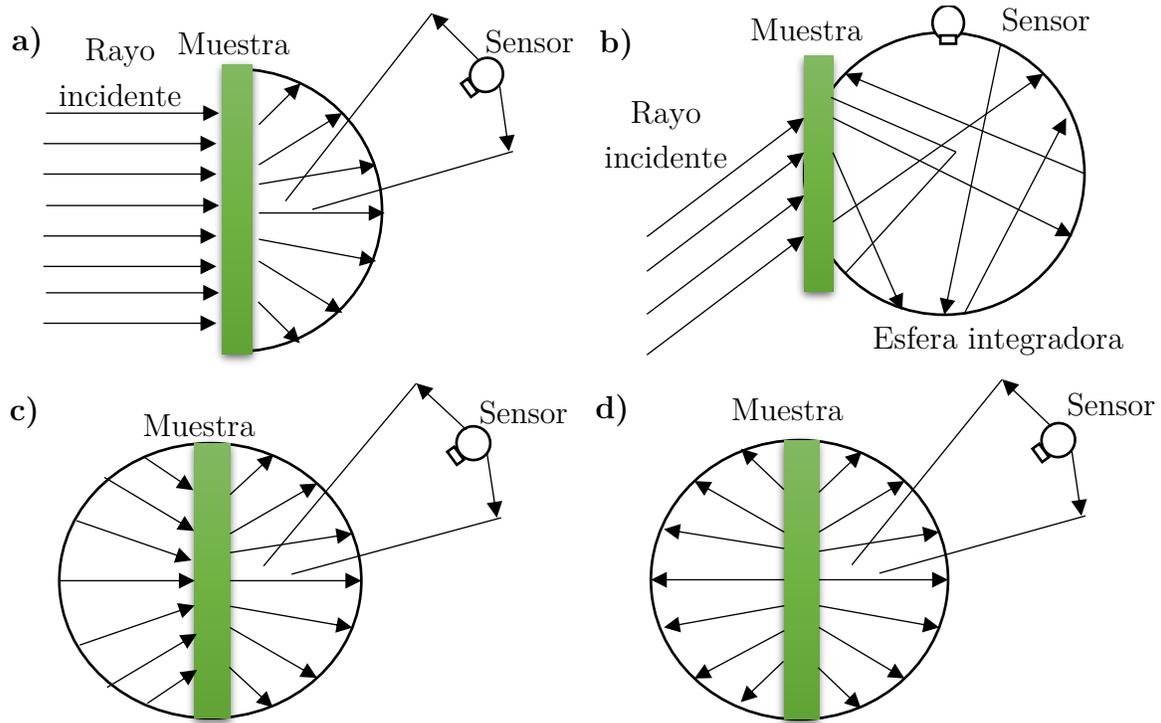


Figura 7. Diferentes configuraciones experimentales para la determinación de características radiativas. Adaptado de [33].

La Figura 8 proporciona un esquema de una esfera integradora, que permite realizar mediciones de reflectancia o transmitancia direccional-hemisférica. Esta esfera es un elemento de equipo comercial en el que la dirección de incidencia se fija en una configuración casi normal a la muestra. Se debe tener en cuenta que las mediciones hemisféricas direccionales son bastante simples y más rápidas de adquirir que las bidireccionales. Por otro lado, la adquisición de datos bidireccional implica mediciones largas y cuidadosas, seguidas de una delicada alineación de la configuración [33].

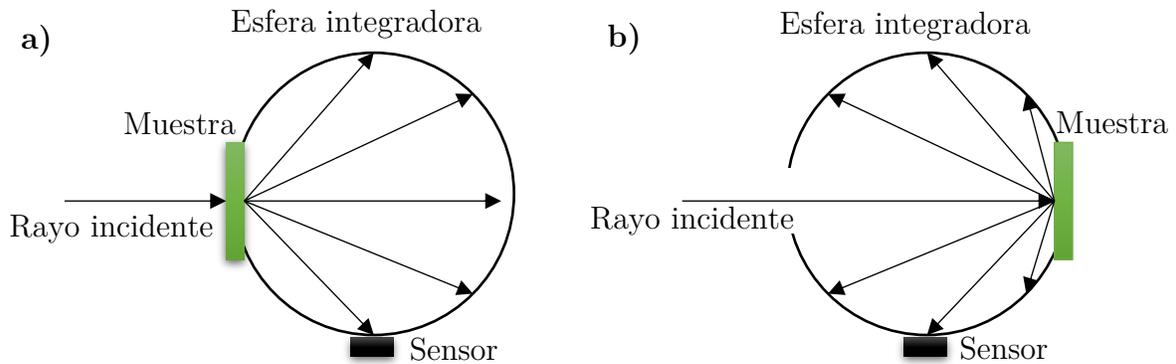
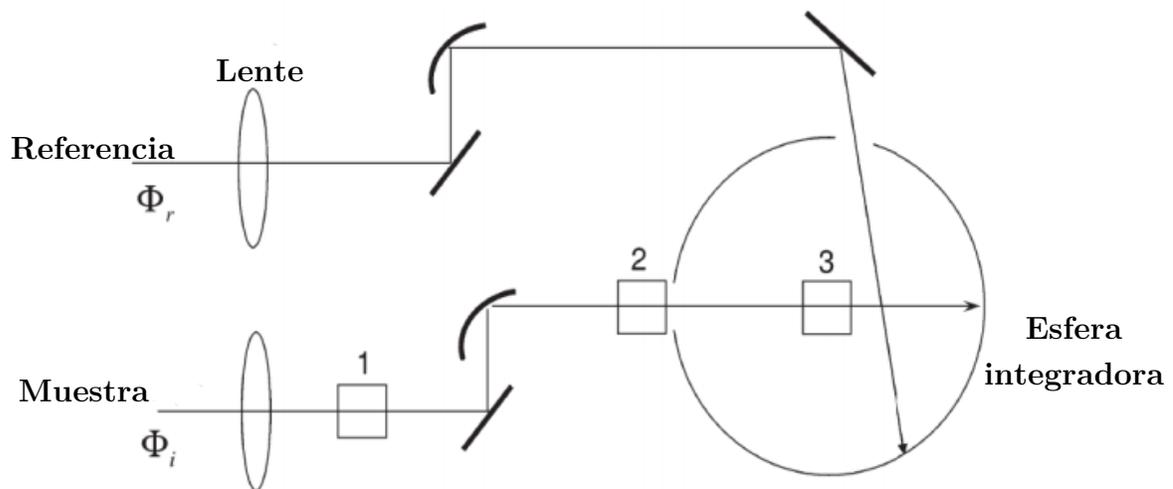


Figura 8. Esfera integradora que permite la medición de: a) transmitancia hemisférica direccional y b) reflectancia hemisférica direccional. Adaptado de [33].

Existen diversos estudios reportados en la literatura en la determinación experimental de características radiativas de microalgas, que emplean las configuraciones anteriormente mencionadas. Por ejemplo, Berberoglu *et al.* [7] determinaron el coeficiente de absorción para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* a partir de la transmitancia espectral hemisférica normal (Figura 8a) y para el coeficiente de extinción utilizaron mediciones de transmitancia espectral normal-normal. Para determinar la función fase de dispersión se utilizó un nefelómetro polar que mide la intensidad de dispersión en función del ángulo polar. Esta metodología también fue puesta en marcha por Pilon *et al.* [8] para la microalga *Chlorococcum littorale* productora de precursores de hidrógeno.

Otros autores que utilizaron la metodología descrita por Berberoglu, fue Hannis en 2013 [34] para determinar las características radiativas de 5 diferentes microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Ettlia texensis*, *Neochloris Oleoabundans*, *Scenedesmus Obliquus* y *Tetraselmis suecica*. Hannis utilizó la configuración experimental mostrada en la Figura 9 para medir la luz dispersa hacia adelante y la transmitida. Esto debido a que medir la dispersión es una tarea más complicada, ya que la luz entrante puede dispersarse en cualquier dirección específica. Aunque, se ha encontrado que las microalgas dispersan la luz fuertemente hacia adelante.



**Figura 9. Configuración para medir la dispersión y la absorción con una esfera integradora [34].**

La configuración experimental mostrada en la Figura 9 tiene como objetivo separar la luz dispersa hacia adelante y la transmitida, los números 1, 2 y 3 muestran la posición de la cubeta, mientras que la lente y los espejos dan forma al haz de luz para que se propague sin obstáculos.

Primero se mide la absorción de la luz (incluida la dispersada hacia adelante) de una muestra de microalgas, en la configuración típica (posición 2). Posteriormente se coloca el soporte de la cubeta (sin microalgas) en la posición 1 a una determinada distancia de la esfera integradora que supone que solo la luz transmitida ingresa a la esfera, y la luz dispersa hacia delante cae fuera del puerto de entrada.

Como se puede observar se utilizan diversos métodos para la determinación de características radiativas de cultivos microalgales, pero con sistemas experimentales similares que permiten medir la energía transmitida, reflejada y dispersada hacia enfrente. Sin embargo, estos aún tienen deficiencias que deben corregirse como la no consideración de la energía dispersada de forma lateral, además, de que utilizar sistemas diferentes para la estimación de cada una de las características radiativas repercute en mayores tiempos de experimentación. Es por ello que Castillo *et al.* [35] propusieron un solo sistema experimental y metodología para la estimación de características radiativas de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, considerando la energía dispersada de forma lateral.

El esquema experimental propuesto por Castillo *et al.* [35] se muestra en la Figura 10, el cual está constituido por una fuente de luz artificial tipo LED de potencia 1 W de luz blanca pura dotado con un disipador de calor para evitar un calentamiento excesivo en el LED y así evitar alguna falla en el mismo, un matraz esférico de vidrio de 250 mL, dos colimadores y sensor óptico con cable de fibra óptica. El matraz esférico se coloca sobre una parrilla con agitación magnética para mantener las microalgas siempre en suspensión.

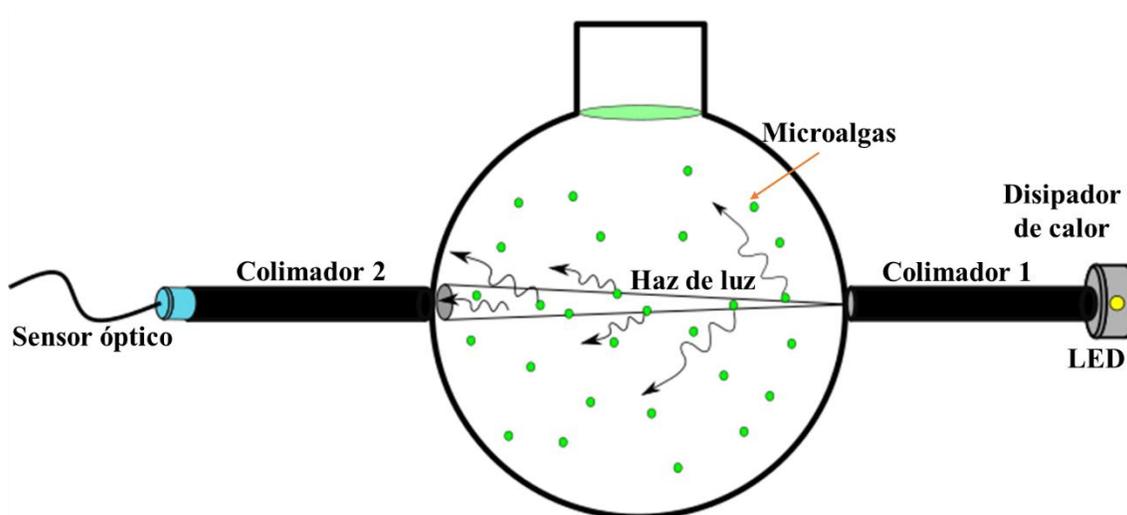


Figura 10. Representación esquemática del sistema experimental para determinación de características radiativas. Tomado de [35].

Para la determinación del coeficiente de extinción se realizan mediciones de intensidad de radiación transmitida normal-normal con y sin microalgas en suspensión, definidas como  $I$  e  $I_0$ , respectivamente. Para ello, la configuración considera dos tubos de colimación, uno al inicio para corregir la emisión difusa del LED y un segundo en el sensor óptico para filtrar la radiación dispersa hacia adelante y medir solo la energía transmitida a través del contenedor esférico. Lo anterior permite utilizar la Ley de Beer-Lambert que asume una caída exponencial de la intensidad de radiación desde la superficie externa del sistema de cultivo:

$$\beta_{\lambda}^* = -\frac{\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)}{Cb \cdot l} \quad (2.7)$$

Donde ( $l$ ) es la distancia que recorren los fotones desde la superficie externa del sistema a la posición bajo consideración, ( $\beta_{\lambda}^*$ ) es el coeficiente de extinción específico, y ( $Cb$ ) es la concentración de microalgas en suspensión. Para poder aplicar esta ley, se consideró que el cultivo de microalgas está perfectamente mezclado e isotrópico (es decir, las características radiativas del cultivo son independientes de la dirección de la luz).

Para la estimación de albedo de dispersión simple ( $\omega_{\lambda}$ ) se utilizó el mismo sistema experimental mostrado en la Figura 10, la única modificación que se hace es omitir el colimador 2, además, se hizo un análisis de las cantidades de energía macroscópicas que interactúan en el sistema.

Castillo *et. al* [35] consideraron que, para concentraciones bajas de biomasa, el fenómeno de dispersión es gobernado por un solo evento de dispersión. Por lo tanto, es válido asumir que:

$$\omega_{\lambda} = \frac{\sigma_{s\lambda}}{\sigma_{s\lambda} + \kappa_{\lambda}} \approx \frac{E_T + E_D^T}{E_{in}} \quad (2.8)$$

Donde  $E_{in}$ ,  $E_T$ ,  $E_D^T$  son la energía que entra al sistema, la que se transmite y la dispersada total a través de éste, respectivamente. Sin embargo, dado que la ecuación (2.8) no siempre es válida, se definió nueva variable que exprese el porcentaje de energía dispersada por el cultivo de microalgas ( $\phi$ ), tal como se indica en la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{E_T + E_D^T}{E_{in}} = f(\omega_{\lambda}) \quad (2.9)$$

Donde Castillo *et al.* [35] comprobaron que para valores de  $\tau \leq 1$  (concentraciones bajas de biomasa) existe una relación lineal entre el albedo ( $\omega_\lambda$ ) y el porcentaje de energía dispersada ( $\Phi$ ).

Finalmente, para determinar la función fase ( $\Phi_\lambda$ ) encontraron que debido a que las microalgas tienden a dispersar hacia enfrente parte de la radiación que incide sobre ellas (lo que coincide con los resultados de [34]) emplear la función de fase de Henyey-Greenstein (ecuación (2.10)) resulta de gran utilidad debido a su simplicidad y su capacidad para capturar un amplio rango de un comportamiento de dispersión ya sea fuertemente hacia atrás o hacia adelante, además de que solo involucra un parámetro de forma, denominado parámetro de asimetría ( $g_\lambda$ ).

$$P_{HG}(\mu_s, g_\lambda) = \frac{1 - g_\lambda^2}{(1 + g_\lambda^2 - 2g_\lambda\mu_s)^{3/2}} \quad (2.10)$$

Donde  $\theta$  es el ángulo entre la dirección de radiación incidente y dispersada en un punto y  $\mu_s$  es el coseno del ángulo de dispersión. Y el parámetro de asimetría se define como:

$$g_\lambda = \frac{1}{2} \int_0^\pi P_\lambda(\theta) \mu_s \sin(\theta) d\theta \quad (2.11)$$

Se concluyó que para valores de  $\tau > 1$  la relación lineal entre albedo ( $\omega_\lambda$ ) y el porcentaje de energía dispersada ( $\Phi$ ) desaparece y hay dependencia del parámetro de asimetría [35]. La metodología descrita anteriormente permitió determinar las características radiativas de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en suspensión de forma independiente y rápida.

La mayoría de los estudios realizados por diversos autores han determinado las características en una sola etapa de crecimiento y posteriormente solo realizan diluciones para obtener diferentes concentraciones de biomasa. Por ejemplo, Berberoglu *et al.* [7] tomaron muestras de cultivos de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en crecimiento activo durante su fase de crecimiento exponencial y realizaron diluciones para obtener 3 concentraciones de biomasa (0.089, 0.139 y 0.184 g/L), encontrando que las secciones transversales de absorción, dispersión y extinción eran independientes de la concentración de biomasa. Mientras que para el albedo de dispersión simple ( $\omega_\lambda$ ) fue superior a 0.5 en todo el espectro de absorción, por lo tanto, la dispersión predominó sobre la absorción, y obtuvieron un parámetro de asimetría ( $g$ ) de 0.98, lo que indica que esta microalga dispersa fuertemente hacia enfrente.

Un estudio similar al anterior fue realizado por Pilon *et al.* [8] para la microalga *Chlorococcum littorale*, donde se utilizó 3 concentraciones celulares ( $3.26 \times 10^{11}$ ,  $3.67 \times 10^{11}$  y  $4.81 \times 10^{11}$  cél/m<sup>3</sup>), encontrado resultados similares a los de Berberoglu *et al.* [7], ya que concluyeron que las secciones transversales de absorción, dispersión y extinción eran independientes de la concentración de biomasa y obtuvieron un parámetro de asimetría (g) de 0.97.

Como se puede observar las características radiativas de diversas especies de microalgas se han determinado experimentalmente en el rango espectral VIS-NIR. No obstante, la mayoría de estas características se han determinado en una sola etapa de crecimiento, generalmente en la etapa estacionaria. Sin embargo, las células de microalgas son partículas más complejas, formadas por una membrana celular que rodea el núcleo, vesículas, mitocondrias, cloroplastos, ribosomas, etc., y otros componentes celulares como lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos. Además, las cantidades relativas de componentes celulares, sus propiedades y tamaño de células cambian durante las diferentes etapas de crecimiento y dependen de su estado fisiológico [36]. Es por ello que se han realizado pocos estudios sobre el efecto del crecimiento celular en las características radiativas [6, 11, 13].

Heng *et al.* [11] fueron de los primeros en determinar las características radiativas de la microalga *Nannochloropsis oculata* en el tiempo y en el intervalo de longitud de onda de 400 a 700 nm, región de radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation, PAR) correspondiente a la radiación útil para la fotosíntesis; la cual fue cultivada en FBRs de placa y bajo iluminación continua mediante LEDs rojos. Encontraron que las secciones transversales de dispersión dominaron en comparación con las de absorción, además de que la diferencia en las secciones transversales de absorción entre los valores mínimo y máximo a una longitud de onda de 676 nm fue de 226 % y para una longitud de 485 nm la diferencia fue de 145 %, lo que confirmó que las características radiativas cambian significativamente en el tiempo.

Zhao *et al.* [13] determinaron las características radiativas en el tiempo de 3 microalgas del género *Chlorella*: *protothecoides*, *vulgaris* y *pyrenoidosa* en la región de 380-850 nm. La sección transversal de dispersión de *Chlorella pyrenoidosa* fue mayor en comparación a las otras dos cepas, esto se atribuyó a que su diámetro celular fue mayor.

De igual forma que Heng *et al.* [11] encontraron que las secciones transversales de absorción y dispersión cambian significativamente con el tiempo, por ejemplo, para *Chlorella pyrenoidosa* las secciones transversales de dispersión disminuyen de  $9 \times 10^{-11} \text{ m}^2$  (15 h) a aproximadamente  $2 \times 10^{-11} \text{ m}^2$  (336 h) a 380 nm, mientras que las secciones transversales de absorción disminuyeron de  $1.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2$  (15 h) a aproximadamente  $0.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2$  (336 h) a 450 nm. Como se puede observar estos valores son 3 veces más grandes, por lo tanto, los autores indican que debido a esto se introducirán grandes errores si solo se utilizan las características radiativas en la etapa estacionaria para el análisis de campo de luz en FBRs.

## Capítulo 3

### 3 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

---

En un cultivo fotoautotrófico, las microalgas dependen de diversos factores para satisfacer su crecimiento y funciones celulares, como pH, temperatura, nutrientes y luz. Sin embargo, una de las mayores preocupaciones en la producción de microalgas es lograr un uso eficiente de la luz en el cultivo. Un diseño adecuado de un fotobiorreactor incluye necesariamente una cinética de crecimiento y la cual está vinculada con la distribución de luz a lo largo del volumen del cultivo. Abordar las características radiativas de una suspensión de microalgas es uno de los puntos importantes para calcular estas cinéticas, sin embargo, las condiciones de cultivo desencadenan un conjunto de procesos fisiológicos a nivel metabólico afectando las características radiativas de las células de microalgas. Es por ello, que estas se deben determinar en diferentes condiciones y etapas de cultivo, para cada cepa de microalga, ya que hasta el momento no existe una base de datos disponible que proporcione esta información, incluso para las cepas de microalgas que actualmente se cultivan a nivel industrial para la producción de pigmentos carotenoides como *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis*.

La determinación de estas características radiativas se usan posteriormente para resolver la RTE y describir adecuadamente la transferencia de radiación en FBRs, lo cual permitiría estimar mejor manera la productividad de biomasa para la obtención de bioproductos de valor agregado, como los pigmentos carotenoides; y aunado a esto tener un mejor diseño, control y optimización de FBRs.

## Capítulo 4

# 4 HIPOTÉISIS Y OBJETIVOS

---

### 4.1 Hipótesis

Las variaciones en la concentración de pigmentos carotenoides en las células de *Coelastrella striolata* en diferentes etapas y condiciones de cultivo, afectarán las características radiativas, debido a sus funciones captadoras y fotoprotectoras de luz.

### 4.2 Objetivos

#### 4.2.1 Objetivo general

Determinar la relación de las concentraciones de pigmentos carotenoides con las características radiativas de un cultivo de *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de cultivo.

#### 4.2.2 Objetivos específicos

- I. Determinar la curva de crecimiento de *Coelastrella striolata*.
- II. Estimar las características radiativas de un cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento y en condiciones para promover la carotenogénesis.
- III. Evaluar el efecto de la combinación de intensidad luminosa y la adición de cloruros al medio de cultivo sobre la concentración de pigmentos carotenoides.

## Capítulo 5

### 5 METODOLOGÍA

A continuación, en cada sección se detalla la metodología utilizada para alcanzar los objetivos planteados.

#### 5.1 Selección de la microalga de estudio

En el Laboratorio de Sistemas y Fuentes de Energías Alternativas (Laboratory of Alternative Energy Sources & Systems, LAESS) del Área de Ingeniería Química de la UAM-I, donde se realizó el presente proyecto de investigación, se tenían diferentes cepas de microalgas: *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, *Scenedesmus* sp., *Coelastrella striolata* y *Coelastrella* sp. (provenientes del cepario de microalgas de la UAM-I). Sin embargo, de acuerdo con la literatura las microalgas del género de *Coelastrella* están emergiendo como microalgas prometedoras para la producción de metabolitos con actividad biológica [4, 37]; especialmente la cepa *Coelastrella striolata* (Figura 11) se presenta como microalga unicelular o en agregaciones de pocas células, tiene un tiempo de duplicación de 24 h, un diámetro entre 9-12  $\mu\text{m}$  y contiene entre 32.7 a 56 mg/g de biomasa seca de carotenoides totales y que como observamos en la Tabla 3 en comparación con otras cepas es productora de los dos carotenoides con mayor demanda comercial (astaxantina y  $\beta$ -caroteno); mientras que de ácidos grasos de 90.8 a 319 mg/g de biomasa seca [27]. Las características antes mencionadas vuelven a este tipo de microalga una cepa atractiva de estudio.

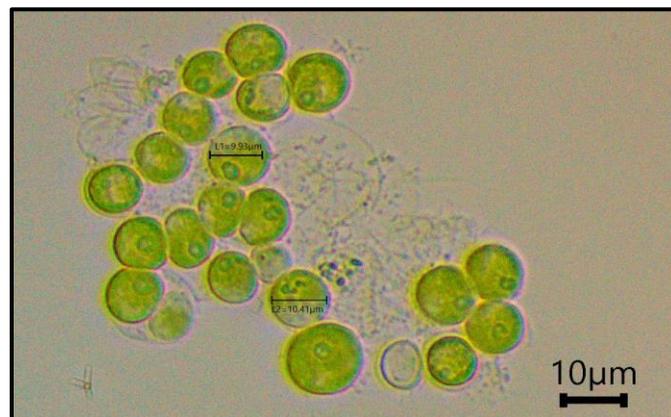


Figura 11. Micrografía óptica de células de *Coelastrella striolata* a un objetivo de 40X.

## 5.2 Conservación y mantenimiento de la cepa

La cepa de *Coelastrella striolata* fue cultivada en una botella de 1 L con fertilizante foliar comercial Bayfolan® Forte (Tabla 5) a una concentración de 1.05 g/L, el cual contiene ingredientes activos como nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) más microelementos, siendo los nutrientes indispensables para el crecimiento de la microalga [35, 38–41]. El cultivo se colocó en un agitador recíprocante con control de temperatura y se mantuvo a  $25 \pm 1$  °C bajo una iluminación de 1500 lux ( $\sim 32 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  s) proveniente de una lámpara LED de 10 W marca MEGAMEX modelo MLDED10 y conectada a un temporizador (timer) para tener un fotoperiodo de 12:12 h y con una relación volumen de cultivo a flujo volumétrico de 91 s.

**Tabla 5. Composición del fertilizante Bayfolan® Forte.**

Sustancia	% p/p
Nitrógeno total (N)	11.470
Fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )	8.000
Potasio ( $\text{K}_2\text{O}$ )	6.000
Azufre (S)	0.230
Zinc (Zn)	0.080
Fierro (Fe)	0.050
Cobre (Cu)	0.040
Boro (B)	0.036
Manganeso (Mn)	0.036
Calcio (CaO)	0.025
Magnesio (MgO)	0.025
Molibdeno (Mo)	0.005
Clorhidrato de tiamina	0.004
Ácido indol acético	0.003
Cobalto (Co)	0.002

Después de 20 días se duplicó en otra botella de 1 L con 50% de medio de cultivo Bayfolan® Forte y 50 % de inóculo, esto se realizó dentro de una campana de flujo laminar y cerca de un mechero Bunsen para evitar contaminación. Cabe mencionar que todo el medio cultivo y equipo a utilizar se esterilizó previamente en una autoclave Aesa® CV300 a 0.09 MPa y 120°C por 20 minutos. Este proceso se repitió hasta obtener 8 L de cultivo para los posteriores experimentos.

### 5.3 Determinación de curvas de crecimiento

Para la determinación de curvas de crecimiento se utilizaron botellas de 1 L acoplado a un sistema de aireación como se muestra en la Figura 12. El suministro de aire fue a través de una bomba de aire (Elite 802), el cual pasaba por un filtro (jeringa filtro estéril de 25 mm de diámetro con una membrana con de PTFE con poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ), posteriormente el aire se humidificó con agua destilada a través de un matraz Kitasato de 1 L con el fin de evitar una disminución en de volumen en el cultivo y posteriormente llegar al cultivo a través de un distribuidor de acero inoxidable. Además, la botella donde se encontraba el cultivo contaba con un tapón de algodón el cual contenía un puerto de muestreo con una jeringa de 10 mL.

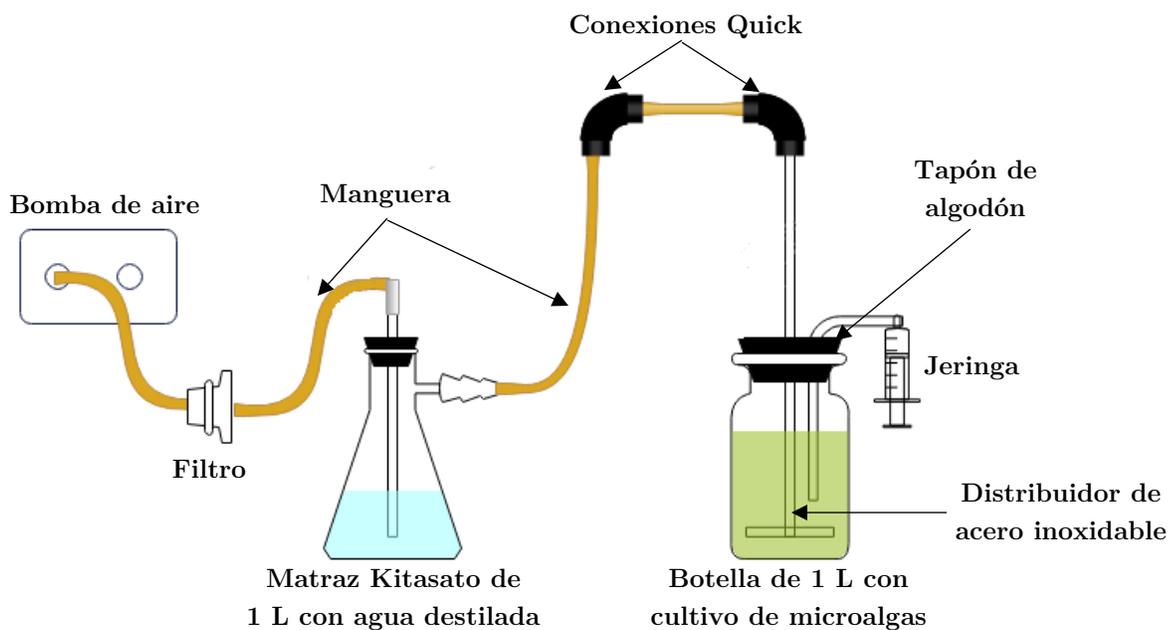


Figura 12. Representación esquemática del sistema de aireación para la determinación de las curvas de crecimiento.

Las condiciones de cultivo para las curvas de crecimiento se muestran en la Tabla 6 y los cultivos se realizaron por triplicado. Se tomaron diariamente muestras de 1 mL durante 30 días y se determinó la concentración de biomasa a través de espectrofotometría UV-vis acoplada a la técnica de peso seco, como se describe a continuación.

**Tabla 6. Condiciones de cultivo para la determinación de las curvas de crecimiento de *Coelastrrella striolata*.**

Parámetro	Valor
Temperatura	25 ± 1 °C
Irradiancia continua	32 μmol/m <sup>2</sup> s
Relación volumen de cultivo a flujo volumétrico de aire	91 s
Medio de cultivo	Bayfolan® Forte con una concentración de 1.05 g/L
Concentración de biomasa inicial	0.17 g/L

### 5.3.1 Determinación de concentración de biomasa mediante peso seco

La concentración de biomasa microalgal se determinó mediante espectrofotometría UV-vis acoplada a la técnica de peso seco. Para ello, primero se pusieron a secar filtros Whatman® GF/F de 0.7 μm de tamaño de poro en una mufla durante 1 hora a 80 °C, después de este tiempo se pesó en una balanza analítica (OHAUS® Discovery) y se registró el peso. Posteriormente se prepararon suspensiones de 10 mL a diferentes porcentajes en volumen (0, 20, 40, 60, 80 y 100 %) de una muestra de cultivo de microalgas que se tenía en conservación. Se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro VELAB® modelo VE-5600UV a 682 nm (ver Anexo I) y se filtró cada muestra al vacío mediante el sistema Millipore Sterifil®. A continuación, los filtros con biomasa se colocaron nuevamente en la mufla a 80 °C y cada 2 h se pesaban de nuevo hasta registrar un peso constante. Por lo tanto, la cantidad de biomasa se estimó por diferencia de pesos del filtro con biomasa seca y el filtro seco sin biomasa.

### 5.3.2 Determinación de concentración de biomasa mediante conteo celular

La concentración de biomasa microalgal también se determinó mediante espectrofotometría UV-vis acoplada a recuento celular. Para ello se prepararon suspensiones de 10 mL a diferentes porcentajes en volumen (0, 20, 40, 60, 80 y 100 %) de una muestra de cultivo de microalgas que se tenía en conservación, de cada una de las muestras se tomó una muestra de 1 μL y se colocó en una cámara de Neubauer de la marca BLAUBRAND® con una profundidad de 0.1 mm y se observó en el microscopio óptico VELAB® modelo VE-T2 bajo un objetivo de 40x. Se realizó el conteo de todas las células ubicadas en los 5 cuadros del cuadrante central y se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro VELAB® modelo VE-5600UV a 682 nm (ver Anexo I).

Los resultados de lo anteriormente descrito se utilizaron para la obtención de una curva patrón de concentración de biomasa y densidad celular de la microalga *Coelastrrella striolata* (ver Anexo II), que se usó posteriormente para estimar la concentración de biomasa de muestras.

### 5.3.3 Análisis de cultivo por microscopía óptica

Durante la elaboración de las curvas de crecimiento se tomaron muestras de 1  $\mu\text{L}$ , en los días 5, 25 y 30 y se observaron en un microscópico óptico VELAB® modelo VE-T2 bajo un objetivo de 40x y mediante la ayuda de una cámara y el software ToupView® fue posible obtener las diferentes imágenes de microscopía óptica del cultivo microalgal de *Coelastrrella striolata*.

### 5.4 Determinación de concentraciones de nutrientes

Se realizó la determinación de concentraciones de 3 nutrientes: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Para ello se tomaron muestras de 5 mL cada tercer día durante 30 días, recuperando el sobrenadante mediante filtración al vacío con el sistema Millipore Sterifil® y realizando diluciones 1:10.

Las concentraciones de nutrientes se evaluaron con un fotómetro de banco multiparamétrico para acuicultura de Hanna Instruments® modelo HI 83203 (Tabla 7) con reactivos comerciales.

**Tabla 7. Técnicas utilizadas para la medición de nutrientes en el fotómetro multiparamétrico HI 83203.**

Nutriente	Técnica*	Intervalo de medición de concentración (mg/L)	Longitud de onda para medición de absorbancia (nm)	Tiempo de reacción (min:seg)
Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )	Reducción de cadmio	0-30	525	04:30
Fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	Método de aminoácidos	0-30	525	05:00
Amonio ( $\text{NH}_4^+$ )	Método Nessler	0-10	420	03:30

\*Todos los métodos son adaptaciones de Hanna Instruments de la técnica original

## 5.5 Identificación y cuantificación de pigmentos

El método tradicional para la cuantificación de clorofila y otros pigmentos en un extracto particular es el análisis espectrofotométrico. Los diferentes compuestos de clorofila y otros pigmentos se cuantifican midiendo la absorbancia de una muestra a longitudes de onda particulares y utilizando ecuaciones simultáneas formuladas para calcular las concentraciones de pigmentos particulares. Sin embargo, existen muchos retos y limitaciones para la cuantificación de pigmentos, ya que las bandas de absorción y emisión de la clorofila b y otros pigmentos se superponen con las de la clorofila a. Los productos de degradación de la clorofila no se detectan y los estudios realizados por diferentes autores proporcionaron diferentes ecuaciones simultáneas [42, 43].

La determinación del contenido de clorofilas a, b y carotenoides totales en las células de microalgas se llevó a cabo de la siguiente manera: Se tomaron muestras de 2 mL de cultivo en tubos Eppendorf de 2 mL, posteriormente se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Science Med modelo MD-2012 eliminando posteriormente el sobrenadante con una pipeta Pasteur de vidrio. La biomasa obtenida se resuspendió con 2 mL de metanol (Meyer®) y se volvió a centrifugar. Cada uno de los tubos Eppendorf se cubrieron con papel aluminio para impedir el paso de la luz y se almacenaron durante 24 horas a 4 °C.

Pasadas las 24 horas, las muestras se retiraron del refrigerador evitando movimientos bruscos (para no resuspender la biomasa). La determinación de las clorofilas a, b y carotenoides totales se realizó con el sobrenadante mediante espectrofotometría UV-vis con un espectrofotómetro VELAB® modelo VE-5600UV, usando metanol como blanco. El contenido de estos pigmentos se calculó a partir de del conjunto de ecuaciones (5.1) propuestas por Lichtenthaler *et al.* [44].

$$\begin{aligned}
 c_a (\mu\text{g} / \text{mL}) &= 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4} \\
 c_b (\mu\text{g} / \text{mL}) &= 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2} \\
 c_{(x+c)} (\mu\text{g} / \text{mL}) &= (1000A_{470} - 1.63c_a - 104.96c_b) / 221
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

Por lo tanto, de acuerdo con el conjunto de ecuaciones (5.1) se midió la absorbancia de los extractos obtenidos a 3 longitudes de onda: 470, 652.4 y 665.2 nm. El conjunto de ecuaciones (5.1) son específicas para la extracción con metanol, ausencia de turbidez y los intervalos de absorbancia aceptables deben ser de 0.3-0.85. Estas ecuaciones espectrofotométricas han sido utilizadas en diversos estudios [26, 38, 45, 46].

## 5.6 Inducción de estrés celular para promover carotenogénesis

Los sistemas de cultivo para la etapa de inducción de estrés celular fueron matraces Erlemeyer de 250 mL con un tapón de algodón y puerto de muestreo (jeringa de 10 mL) y adición de alguna sal (NaCl o MgCl<sub>2</sub>) al medio de cultivo (Tabla 8). Estos fueron colocados en un agitador recíprocante con controlador de temperatura, el cual contaba con cuatro divisiones con el objetivo de que todos los sistemas de cultivo recibieran la misma cantidad de luz. Las lámparas fluorescentes se colocaron en la parte superior de los matraces y se ajustó al valor mostrado en la Tabla 8. En la Figura 13 se muestra el sistema experimental descrito anteriormente.

**Tabla 8.** Condiciones de cultivo para la etapa de estrés celular de *Coelastrrella striolata*.

Parámetro	Valor
Temperatura	25 ± 1 °C
Irradiancia continua	250 μmol/m <sup>2</sup> s
Volumen de cultivo	200 mL
Medio de cultivo	Bayfolan® Forte con una concentración de 1.05 g/L
Concentración de sal*	0, 0.5, 1.0 y 1.5 % p/p NaCl (0, 0.086, 0.173 y 0.260 M Cl <sup>-</sup> ) 0, 0.4, 0.8 y 1.2 % p/p MgCl <sub>2</sub> (0, 0.086, 0.173 y 0.260 M Cl <sup>-</sup> )
Concentración de biomasa inicial	0.30 g/L
Tiempo de cultivo	35 días

\*El ajuste se realizó para tener la misma concentración de iones Cl<sup>-</sup>

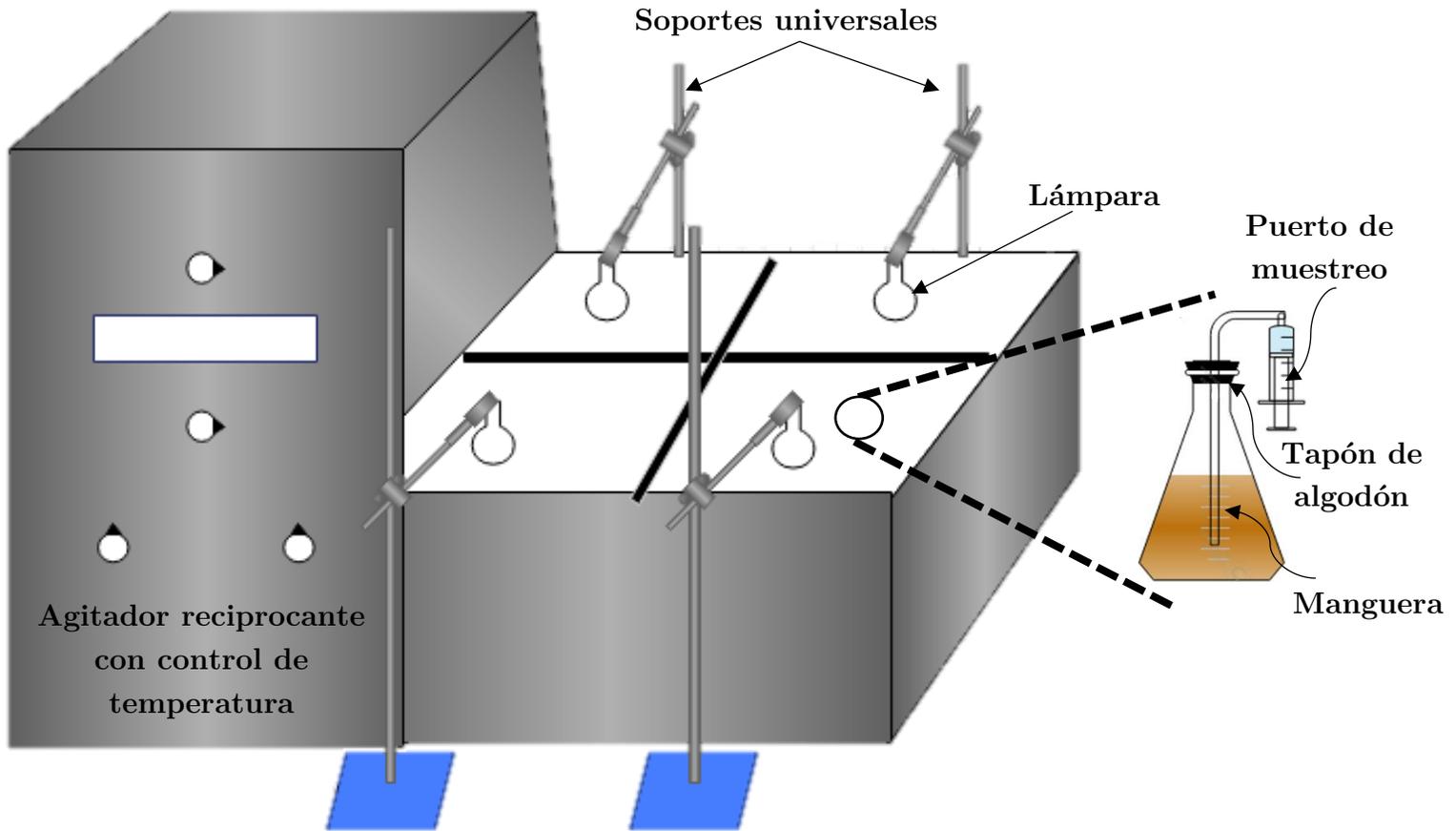


Figura 13. Configuración experimental para la inducción de estrés celular de *Coelastrella striolata*.

### 5.7 Análisis de extractos por espectroscopía infrarroja

Después de realizar la extracción de pigmentos de acuerdo con lo descrito en la sección 5.5. Los extractos fueron analizados por espectroscopía infrarroja (IR) con un espectrofotómetro FT-IR PerkinElmer® (Spectrum Two) en un intervalo de número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Para ello se tomaron 3 gotas de cada muestra y se colocaron en el detector de  $\text{LiTaO}_3$ ; los espectros se obtuvieron mediante el software Spectrum 10.

## 5.8 Determinación de características radiativas

La determinación de características radiativas del cultivo de *Coelastrrella striolata* en suspensión se llevó a cabo mediante la estrategia experimental desarrollada por Castillo *et al.* [35] la cual se describirá a continuación. Esta metodología se aplicó a tres casos: a una muestra de cultivo en mantenimiento para analizarlas en función de la concentración de biomasa, después en diferentes etapas de crecimiento y en condiciones para inducir la carotenogénesis de la microalga *Coelastrrella striolata* bajo un  $\tau \leq 1$ . Los resultados experimentales obtenidos se integraron en simulaciones numéricas en Matlab® utilizando el método de Monte Carlo Ray Tracing (MCRT) (ver Anexo III).

### 5.8.1 Coeficiente de extinción ( $\beta_\lambda^*$ )

El coeficiente de extinción de la microalga *Coelastrrella striolata* en suspensión, se determinó en la región PAR (400-700 nm). El sistema experimental a emplear se muestra en la Figura 10, el cual está constituido por una fuente de luz artificial tipo LED de potencia de 1 W de luz blanca pura (Siled®, LED-P3W200-120/41) dotado con un disipador de calor (Siled®, LED-Disipador-3W) con dimensiones de 5.3 cm de largo y 2.2 cm de ancho para evitar un calentamiento excesivo en el LED, un matraz esférico de vidrio Pyrex con dimensiones de 4.12 cm de radio, 27 cm de circunferencia y capacidad de 260 mL, dos colimadores de material NYLOMAQ negro de 15 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro, un agitador magnético de 2 cm de longitud, una parrilla de agitación magnética (Ciblanc®). Finalmente, el sistema cuenta con sensor óptico con cable de fibra óptica de 2 m de longitud (StellarNet Inc, F600-UVVIS-SR) conectado a un espectroradiómetro (StellarNet Inc, Black-Comet C-50). Finalmente, el sistema se operó dentro de una caja oscura para evitar cualquier interferencia de luz externa.

Para iniciar la corrida experimental se alineó correctamente el matraz con los colimadores, posteriormente se llenó el matraz esférico con solo medio de cultivo Bayfolan® Forte y se encendió el LED para generar un haz de luz que se propagó a través del primer colimador, pasando por el matraz y llegando hasta el final del segundo colimador donde con ayuda del sensor óptico se midió el valor de la intensidad de radiación transmitida y se registró como ( $I_0$ ). Posteriormente se agregó la muestra con microalgas y se dejó agitar de 3 a 5 minutos para homogeneizar con la parrilla de agitación magnética. Una vez pasado este periodo de tiempo se registró la medida de

intensidad de radiación transmitida a través del cultivo de microalgas definida como ( $I$ ).

Las mediciones obtenidas fueron el resultado del promedio de dos espectros. Una vez obtenidas ( $I$ ) e ( $I_0$ ), el coeficiente de extinción se calculó a partir de la ecuación (2.7).

### 5.8.2 Albedo promedio y espectral a partir del porcentaje de energía dispersada ( $\phi$ )

El porcentaje de energía dispersada ( $\phi$ ) para la estimación de albedo de la microalga *Coelastrella striolata* en suspensión, se determinó en la región PAR (400-700 nm) al igual que el coeficiente de extinción. El sistema experimental utilizado para determinar esta característica radiativa se muestra en la Figura 14, como se puede observar es el mismo sistema que el utilizado para el coeficiente de extinción, pero suprimiendo el colimador 2.

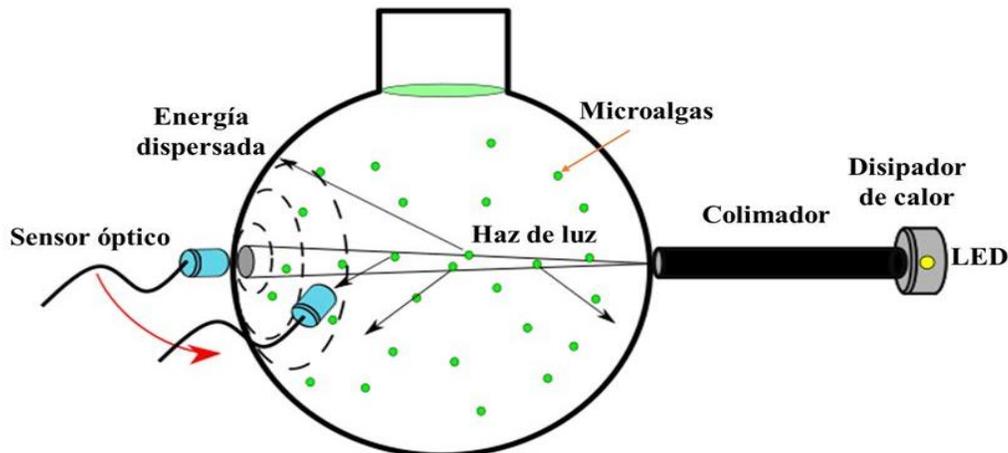


Figura 14. Sistema experimental para la determinación del albedo ( $\omega_\lambda$ ) y parámetro de asimetría ( $g$ ) del cultivo de microalgas. Tomado de [35].

Para calcular la energía saliente del sistema, que se define en la ecuación (2.9), se realizaron 12 mediciones en diferentes puntos a lo largo de la circunferencia del recipiente esférico, cada una de estas mediciones se realizó por triplicado (con una desviación  $< 5\%$ ). La primera medición se realizó en el extremo opuesto del haz incidente, punto donde el haz de luz se proyectó. En ese punto se midió la energía transmitida y dispersada hacia enfrente. Después las 11 mediciones restantes se realizaron sobre la superficie del recipiente esférico y cada punto de medición fue equidistante el uno del otro; la suma de todas estas medidas, por su área de superficie correspondiente en la esfera es igual a la energía dispersada total ( $E_D^T$ ).

### 5.8.3 Parámetro de asimetría ( $g$ ) de la función fase ( $\Phi$ )

Al igual que el coeficiente de extinción y el porcentaje de energía dispersada para estimar albedo, el parámetro de asimetría ( $g$ ) fue determinado en la región PAR (400-700 nm). El sistema experimental utilizado fue el mismo que para determinar el porcentaje de energía dispersada (Figura 14).

Se realizaron 11 mediciones a diferentes ángulos sobre la superficie de la esfera, equidistantes una de la otra. Las mediciones se registraron con un sensor óptico con cable de fibra óptica de 2 m de longitud conectado a un espectrorradiómetro. Las mediciones se hicieron desde un ángulo igual a  $20^\circ$  hasta un ángulo igual a  $160^\circ$ .

El esquema de la Figura 15 representa el fenómeno de dispersión provocado por los microorganismos en suspensión y medir la cantidad de energía dispersada en diferentes posiciones angulares permite observar si la energía dispersada es hacia adelante o hacia atrás. El ángulo de  $180^\circ$  representa la posición por donde el haz de luz incide al sistema mientras que el ángulo de  $0^\circ$  representa la posición donde se proyecta el haz de luz después de propagarse a través del sistema.

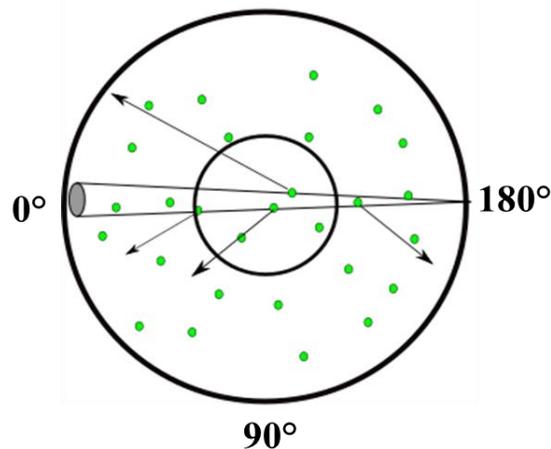


Figura 15. Representación esquemática del fenómeno de dispersión lateral a diferentes ángulos provocado por la interacción de fotones con microalgas (vista superior del sistema esférico). Tomado de [35].

En la Figura 16 se muestra esquemáticamente el proceso de estimación de características radiativas del cultivo de microalgas en suspensión. Este proceso se repite para diferentes intervalos de longitud de onda, por lo tanto, se calculan las características radiativas espectrales del cultivo de microalgas:  $\beta_\lambda^*$ ,  $\omega_\lambda$  y  $g_\lambda$ .

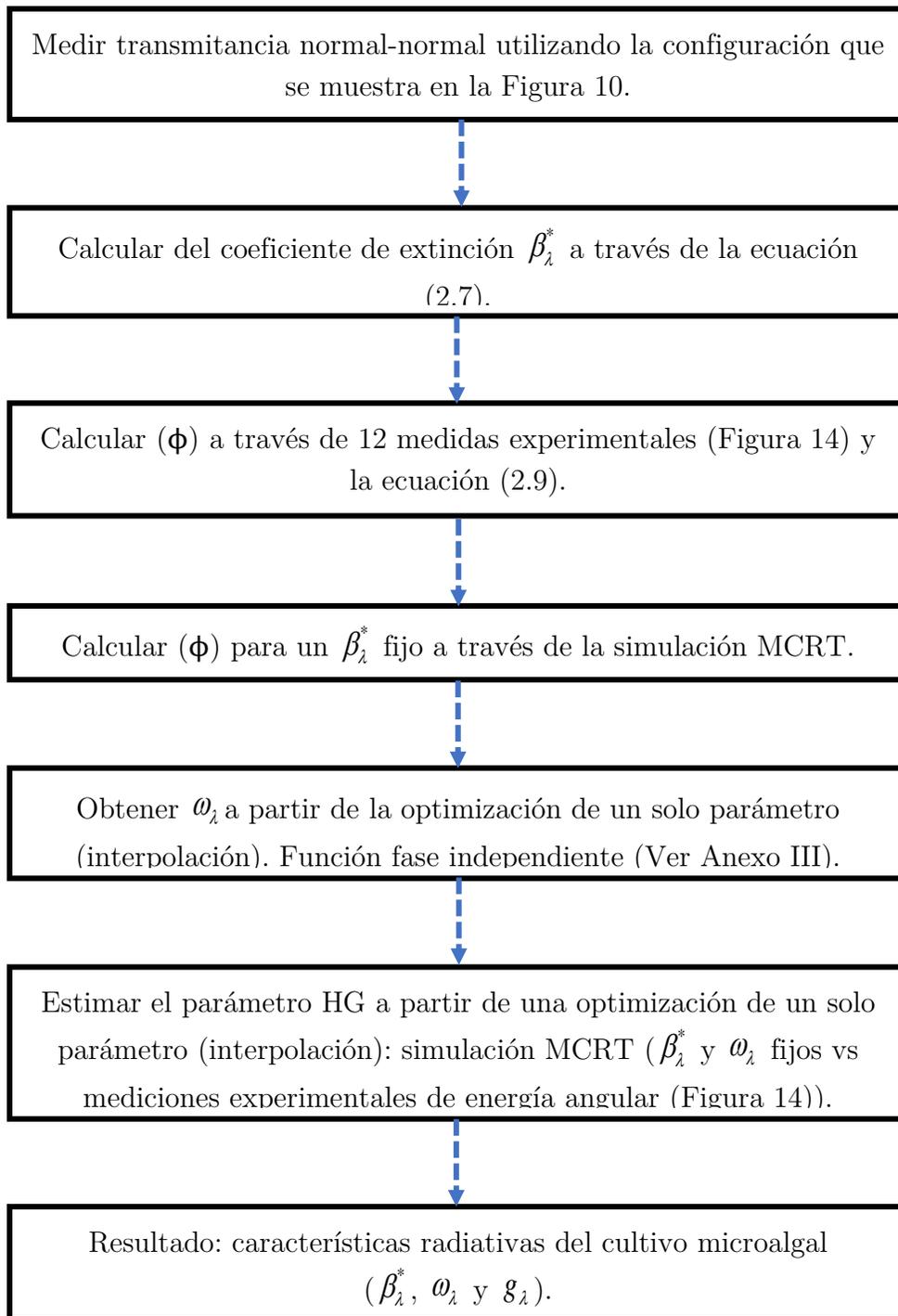


Figura 16. Diagrama de bloques de la metodología para estimar características radiativas de microalgas en suspensión. Adaptado de [35].

## Capítulo 6

# 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Cultivo de *Coelastrrella striolata* en etapa verde

#### 6.1.1 Curva de crecimiento de *Coelastrrella striolata*

En la Figura 17 se muestra el crecimiento de la microalga *Coelastrrella striolata* en medio de cultivo Bayfolan® Forte y las condiciones de cultivo mencionadas en la Tabla 6.

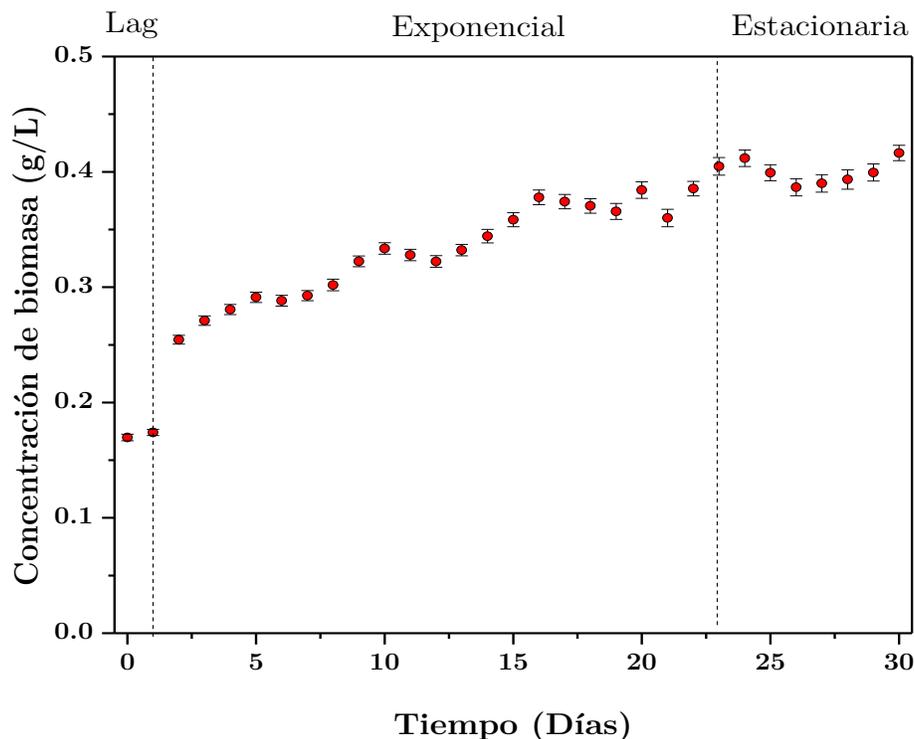


Figura 17. Curva de crecimiento de *Coelastrrella striolata* en medio Bayfolan® Forte.

Se distinguieron 3 etapas de crecimiento: la de adaptación con una duración de 2 días, la etapa exponencial con duración 21 días y se alcanzó el estado estacionario en 23 días. La concentración inicial del cultivo fue de 0.17 g/L y alcanzó una concentración máxima de biomasa de 0.42 g/L, es decir, 2.5 veces lo inicial.

Aunque se tiene poca información sobre esta cepa de microalga, Abe *et al.* [27] encontraron que el estado estacionario de *Coelastrella striolata* var. *multistriata* se alcanzó después de los 20 días de cultivo alcanzando una concentración de biomasa de 2.8 g/L bajo una intensidad luminosa continua de 65  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  (el doble al utilizado en el presente estudio), una temperatura de 25 °C y 500 mg/L de  $\text{NaNO}_3$ .

Los datos mostrados en la Figura 17 se pueden ajustar a un modelo matemático no lineal de crecimiento conocido como “modelo primario” y del cual se obtienen parámetros cinéticos. Los modelos más utilizados para describir este crecimiento microalgal son: el modelo de Gompertz y el logístico mostrados en las ecuaciones (6.1) y (6.2), respectivamente [47–51].

$$\frac{d(Cb)}{dt} = \mu \cdot C_b \cdot \ln\left(\frac{Cb_{m\acute{a}x}}{Cb}\right) \quad (6.1)$$

$$\frac{d(Cb)}{dt} = \mu \cdot C_b \left(1 - \frac{Cb}{Cb_{m\acute{a}x}}\right) \quad (6.2)$$

Si integramos las ecuaciones (6.1) y (6.2) se obtiene:

$$Cb(t) = Cb_0 \cdot \exp\left[\ln\left(\frac{Cb_{m\acute{a}x}}{Cb_0}\right)(1 - \exp(-\mu t))\right] \quad (6.3)$$

$$Cb(t) = \frac{Cb_{m\acute{a}x}}{1 + \left(\frac{Cb_{m\acute{a}x}}{Cb_0} - 1\right)\exp(-\mu t)} \quad (6.4)$$

Donde  $Cb$  es la concentración de biomasa (g/L) al tiempo  $t$  (día),  $Cb_0$  es concentración de biomasa inicial (g/L),  $Cb_{m\acute{a}x}$  es la concentración máxima que el sistema puede alcanzar (g/L) y  $\mu$  es tasa de crecimiento específica aparente ( $\text{día}^{-1}$ ) [49].

Los datos mostrados en la Figura 17 fueron ajustados con los modelos mostrados en las ecuaciones (6.3) y (6.4). Se aplicó una regresión no lineal, usando para ello el paquete estadístico OriginPro 2017.

En La Figura 18 se puede observar el ajuste realizado a los datos experimentales obtenidos con los modelos de Gompertz y Logístico.

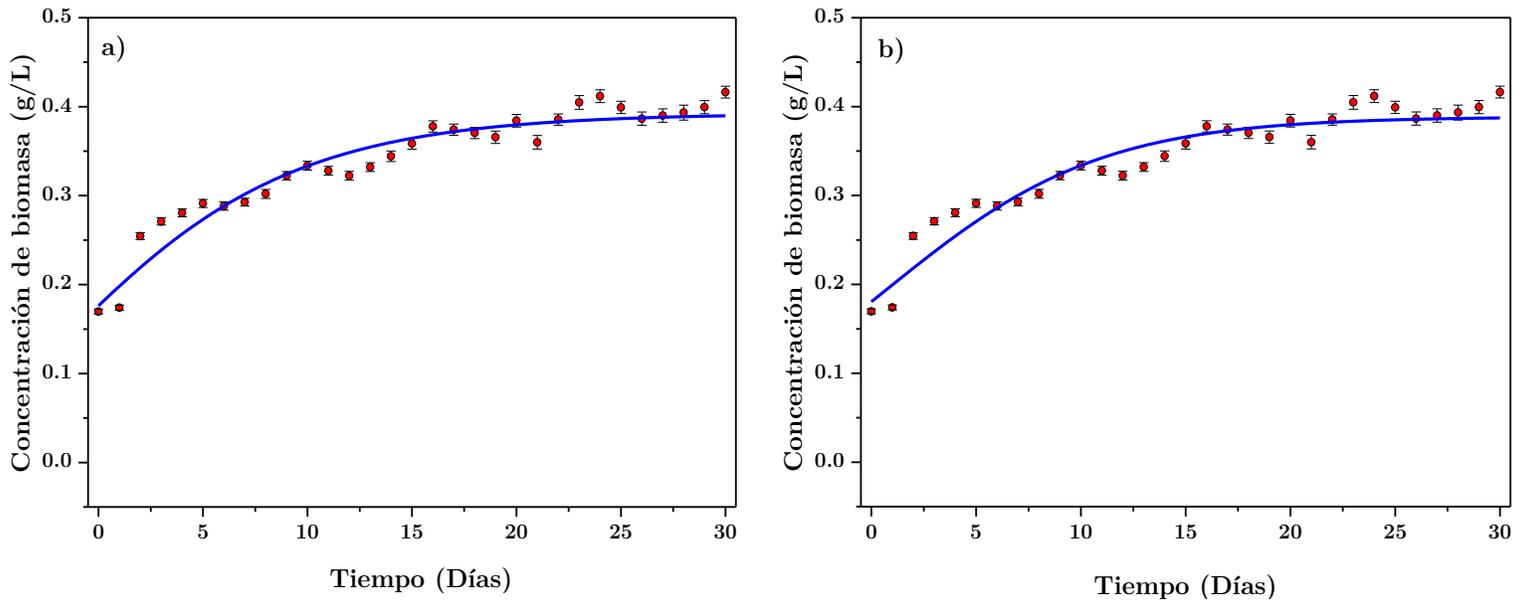


Figura 18. Ajuste de datos experimentales a modelos primarios. a) Modelo de Gompertz y b) Modelo logístico.

Los valores de  $R^2$  fueron superiores a 0.90 como se puede observar en Tabla 9, es por ello que se puede apreciar en la Figura 18 que el ajuste de los datos experimentales es similar para ambos modelos utilizados, el modelo de Gompertz describió el 94 % de la variabilidad de los datos experimentales, mientras que el modelo logístico describió el 93.2 %.

Tabla 9. Parámetros de ajuste para modelos primarios.

Modelo	$\mu$ ( $d^{-1}$ )	$Cb_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$R^2$
Gompertz	$0.159 \pm 0.020$	$0.392 \pm 0.010$	0.940
Logístico	$0.195 \pm 0.023$	$0.388 \pm 0.010$	0.932

En la Tabla 9 se muestran los parámetros de ajuste para cada modelo utilizado, donde podemos observar que  $Cb_{m\acute{a}x}$  prácticamente es la misma para ambos modelos, sin embargo, la tasa de crecimiento específica aparente ( $\mu$ ) obtenida por el modelo logístico es similar a la obtenida por Abe *et al.* [27] para la microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* fue de  $0.22 d^{-1}$ .

### 6.1.2 Micrografías ópticas del cultivo de *Coelastrella striolata*

En la Figura 19 se muestran las micrografías del cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* a diferentes tiempos: 5, 25 y 30 días de cultivo. Las células se observan aglomeradas y formando pequeñas colonias, es importante mencionar que estas micrografías pertenecen a los cultivos madre.

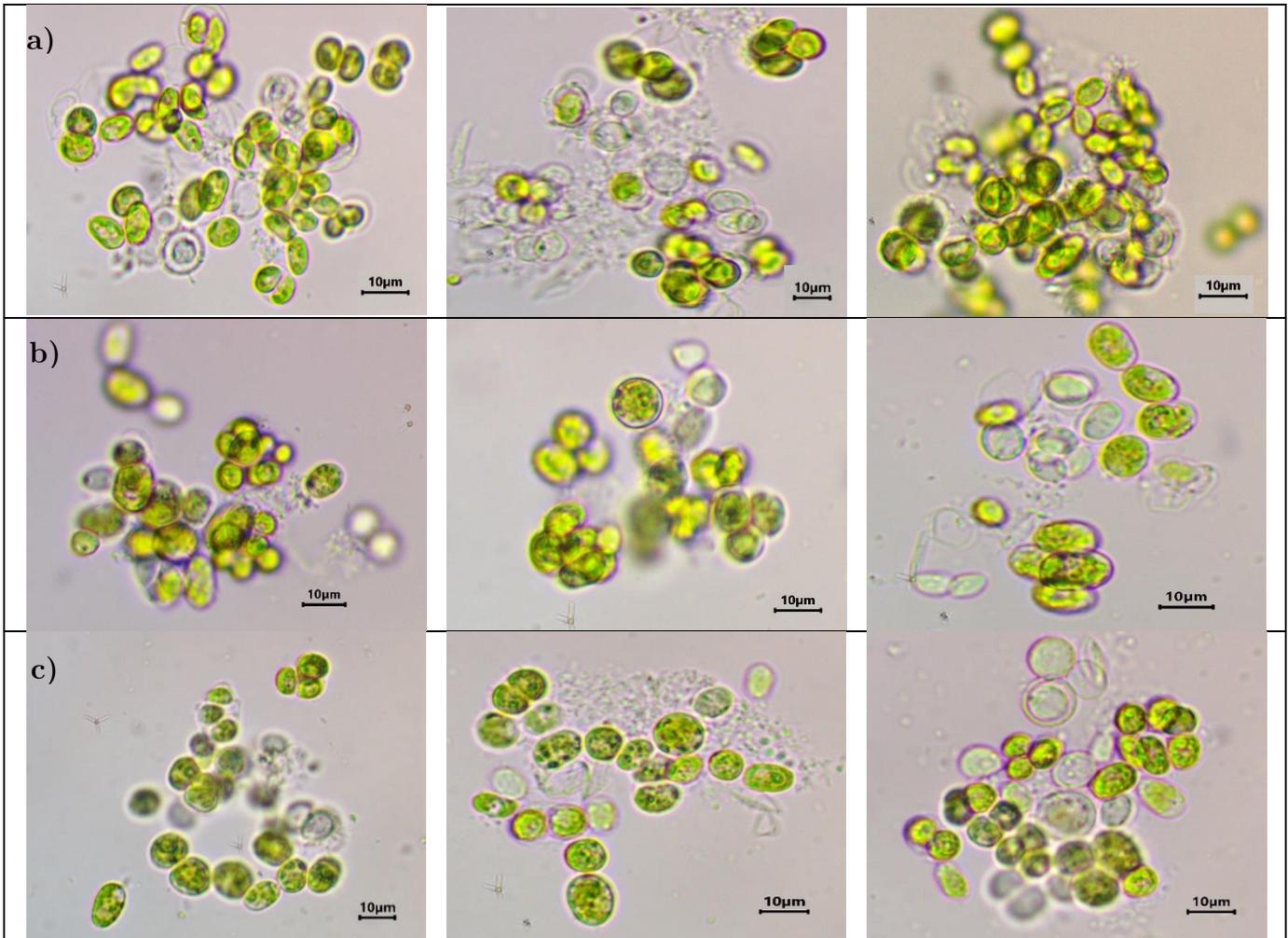


Figura 19. Micrografías ópticas (40X) de células de *Coelastrella striolata* a lo largo de su crecimiento (por triplicado). a) 5 días, b) 25 días y c) 30 días.

El tamaño de las células del día 5 en comparación con las del día 30 no son significativamente diferentes. Esto se pudo comprobar analizando el tamaño de las distintas células mediante el Software ToupView®, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Tamaño promedio de células del cultivo de *Coelastrella striolata*.

Día	Tamaño promedio de células ( $\mu\text{m}$ )
5	$9.77 \pm 1.06$
25	$9.78 \pm 1.14$
30	$9.76 \pm 1.14$

### 6.1.3 Consumo de nutrientes por *Coelastrella striolata*

En la Figura 20 se muestran las concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo en función del tiempo. En cuanto a fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) se puede observar que se comenzó con una concentración inicial de  $107.5 \pm 9.2$  mg/L y después de los 6 días de cultivo la concentración se mantuvo aproximadamente constante en  $93 \pm 3.6$  mg/L, esto quiere decir que solo el 13.2 % del total fue consumido por la microalga. Sin embargo, aunque el fosfato no se consumió en su totalidad, no limitó el crecimiento de la microalga en el presente estudio.

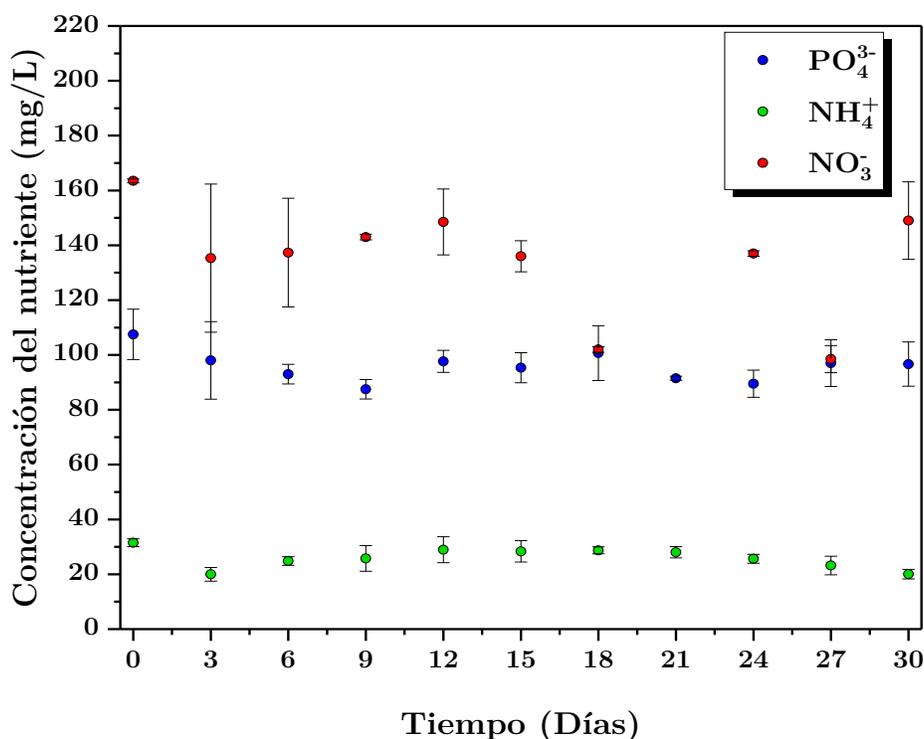


Figura 20. Concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo en función del tiempo.

El fósforo es un nutriente esencial que constituye un poco menos del 1 % de la biomasa total de algas y se requiere aproximadamente entre 0.03 y 0.06 % en el medio para mantener el crecimiento de las algas. Además, es esencial para producir componentes celulares como fosfolípidos, ADN, ARN y ATP para las rutas metabólicas que implican la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos [52].

La Figura 20 también muestra las concentraciones de las especies nitrogenadas en función del tiempo. En cuanto al amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se puede observar que no hubo un consumo apreciable de amonio, se inició con una concentración  $31.5 \pm 1.4$  mg/L y al igual que fosfato después del día 6, ya no hubo consumo de este nutriente manteniéndose en un valor aproximadamente de  $20 \pm 2.5$  mg/L, es decir, solo se consumió el 36.5 % del total. En cuanto al nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), la concentración inicial fue de  $163.5 \pm 0.7$  mg/L y al día 6 alcanzó una concentración de  $137.3 \pm 19.9$  mg/L, es decir, solo se consumió el 16 % del total.

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento de microalgas y juega un papel importante en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos [52]. Las microalgas pueden asimilar el nitrógeno en forma de nitrito, nitrato, urea y amonio. Sin embargo, diversos estudios realizados han demostrado que la fuente preferida de las microalgas es el amonio, ya que en su presencia la absorción y asimilación de otros compuestos orgánicos e inorgánicos se inhiben con frecuencia y, en algunos casos, se eliminan por completo. Por ejemplo, se ha encontrado que el nitrato se inhibe en presencia de amonio [53].

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que a pesar de que el amonio y el nitrato se encuentren presentes en el medio, la microalga *Coelastrrella striolata* es más afín al consumo de amonio. Además de que las fuentes de fósforo y nitrógeno presentes en el medio de cultivo no se agotaron, su consumo fue del 13.2 % para fosfato, 36.5 % para amonio y 16 % para nitrato; aunque ya no hubo consumo apreciable de estos nutrientes después del día 6, no se limitó el crecimiento de la microalga.

Cabe mencionar que, durante la experimentación, se observó sedimentación parcial de las células y que éstas se adherían a la parte inferior del FBR, esto pudo deberse a que no se tenía agitación mecánica y la aireación no era suficiente para mantener las células en suspensión. Lo anterior implica que la concentración promedio de biomasa en el cultivo fue en realidad mayor al estimado, pero también que la transferencia de nutrientes a las células puede haberse afectado.

#### 6.1.4 Identificación de pigmentos en extractos

La determinación de pigmentos se realizó sobre los extractos con metanol de las muestras de cultivo tomadas cada 5 días. En la Figura 21 se muestra la concentración de clorofilas y carotenoides totales. Al quinto día de cultivo la concentración de clorofila a fue de 7.88 mg/g de biomasa seca, mientras que para clorofila b y carotenoides fue de alrededor de 2.90 mg/g de biomasa seca. Se puede observar que la concentración de clorofila disminuye después del día 5 alcanzado un valor de 1.95 mg/g de biomasa seca para el día 30.

El contenido de pigmentos en células de microalgas puede variar conforme a la velocidad de crecimiento, las condiciones de cultivo y la etapa de crecimiento. Diversos estudios han encontrado que las bajas intensidades luminosas promueven un mayor contenido de clorofilas y probablemente se deba a las adaptaciones de luz/sombra que mejoran el uso de la energía de la luz [54].

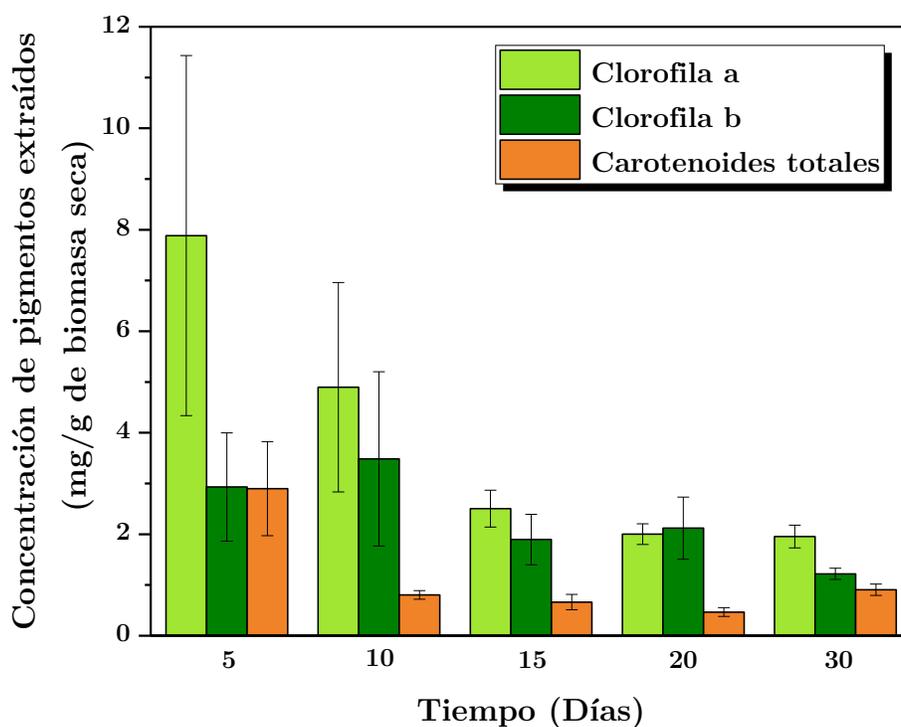


Figura 21. Concentración de clorofilas y carotenoides totales extraídos del día 5 al día 30 de cultivo de *Coelastrella striolata*.

Un mayor contenido de clorofilas se asocia más a la absorción y disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la disponibilidad de nitrógeno y fósforo; ya que el primero forma parte de la estructura y estabilización de la clorofila, mientras que el segundo es esencial para la síntesis de ATP necesario para varios procesos celulares, incluida la biosíntesis de clorofila [18, 54–56]. Esto podría explicar por qué la concentración de clorofila a en las células de *Coelastrrella striolata* disminuye con el paso de los días ya que después del día 6 no hay un consumo significativo de N ni P.

También se puede apreciar en la Figura 21 la concentración de carotenoides totales por gramo de biomasa seca como función del tiempo, empezando con una concentración de 2.9 mg/g de biomasa seca y disminuyó a una concentración 0.8 mg/g de biomasa seca para el día 10; y después de estos días no hubo diferencias significativas en la síntesis y acumulación de estos pigmentos. Este comportamiento se podría atribuir a que la aireación no fue suficiente para mantener las células en suspensión y, por lo tanto, la transferencia de CO<sub>2</sub> a las células se vio afectado; se sabe que las microalgas al ser microorganismos fotosintéticos necesitan una fuente de carbono como CO<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo, cuya disponibilidad no solo es crucial para la producción de biomasa sino también para la producción de biomoléculas, incluidos los carotenoides [18, 55, 56].

En la Tabla 11 se muestran las cantidades relativas de pigmentos. De acuerdo con Lichtenthaler [44] la relación peso entre clorofila a y clorofila b (a/b) es un indicador de que el pigmento es funcional y de la adaptación a la luz del aparato fotosintético. Es por ello que esta relación debe ser mayor a 1.1 y la disminución de esta relación puede deberse a que las células pueden estar expuestas a una mayor cantidad de luz. Como se puede observar en la Tabla 11 los valores (a/b) son mayores a 1, presentando la relación mayor en los primeros días de cultivo.

**Tabla 11. Cantidades másicas relativas de pigmentos en células de *Coelastrrella striolata* a través del tiempo.**

Días	Clorofila a/Clorofila b (a/b)	Clorofilas/Carotenoides totales (a+b/x+c)
5	2.69 ± 2.19	3.73 ± 2.79
10	1.28 ± 1.28	10.4 ± 5.78
15	1.32 ± 0.54	6.64 ± 2.80
20	0.94 ± 0.37	8.84 ± 3.39
30	1.60 ± 0.33	3.50 ± 0.80

La relación peso de clorofilas a y b y de carotenoides totales ( $(a+b)/x+c$ ) es un indicador del verdor de las células. Esta relación normalmente se encuentra entre 4.2 y 5 para plantas expuestas al sol y entre 5.5 y 7 para plantas expuestas a la sombra. Valores más bajos son un indicador de senescencia (envejecimiento de células), estrés y daño al microorganismo y al aparato fotosintético, que se expresa como una descomposición más rápida de clorofilas que de carotenoides. En el presente estudio se aprecia en la Tabla 11, que los valores de esta relación se mantuvieron dentro de los valores reportados, por lo tanto, se podría decir que no hubo una afectación o daño al aparato fotosintético de la microalga.

## 6.2 Características radiativas de *Coelastrrella striolata* en suspensión en etapa estacionaria

### 6.2.1 Coeficiente de extinción específico promedio

En la Figura 22 se muestra el coeficiente de extinción específico promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) de la microalga *Coelastrrella striolata* en suspensión en función de la concentración de biomasa (0.008, 0.010 y 0.016 g/L). Se puede observar que el coeficiente de extinción específico determinado experimentalmente es constante e independiente de la concentración, alcanzando un valor de  $0.698 \pm 0.007 \text{ m}^2/\text{g}$ .

En la Figura 22 también se pueden observar valores del coeficiente de extinción específico promedio de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 reportados por Castillo *et al.* [35]. Se puede observar el mismo comportamiento que para *Coelastrrella striolata*; es decir,  $\bar{\beta}^*$  es independiente de la concentración de biomasa. Sin embargo, el valor para *Coelastrrella striolata* es aproximadamente 2.3 veces menor que el de *Chlorella vulgaris*. Esto puede deberse al tamaño de las células, ya que el tamaño de las células de *Coelastrrella striolata* oscila entre 9-12  $\mu\text{m}$  mientras que el de las células de *Chlorella vulgaris* se encuentra entre 4-6  $\mu\text{m}$ . Dado que el coeficiente de extinción es una medida de la probabilidad de interacción entre los fotones y las partículas (en este caso las microalgas en suspensión), tener un menor tamaño de células implica un mayor número de ellas, a una misma concentración de biomasa, una mejor distribución de las mismas y en consecuencia tener una mayor probabilidad de interacción con los fotones.

El comportamiento del coeficiente de extinción de *Coelastrrella striolata* es igual que para el de *Chlorella vulgaris*, lo que sugiere que no hay diferencias en el tamaño de los aglomerados y que este solo cambia para contrarrestar condiciones adversas a su crecimiento.

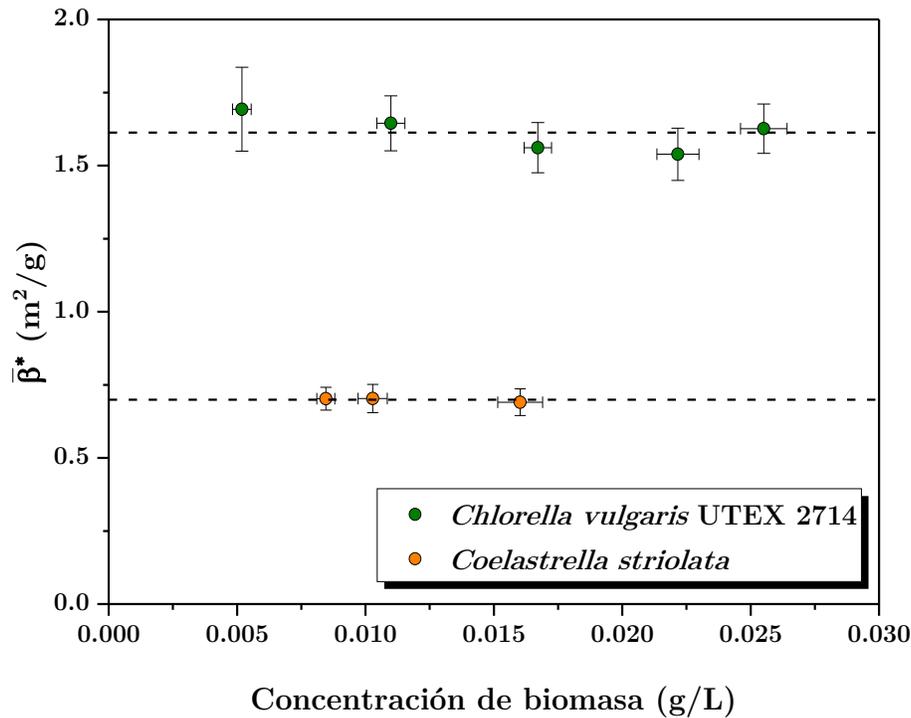


Figura 22. Coeficiente de extinción específico promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) de las microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 y *Coelastrella striolata* a diferentes concentraciones de biomasa.

### 6.2.2 Coeficiente de extinción específico espectral

En la Figura 23 se muestra el coeficiente de extinción específico espectral ( $\beta_\lambda^*$ ) en la región PAR (400-700 nm) de la microalga *Coelastrella striolata*, resultado del promedio de 3 diferentes concentraciones de biomasa (0.008, 0.010 y 0.016 g/L).

Como se puede observar la mayor variación del coeficiente de extinción se encuentra en la región de 400-410 nm y de 690-700 nm, esto se debe a que la fuente de luz utilizada tiene una baja emisión (ver Anexo IV), por lo que ocasiona estas fluctuaciones.

En el intervalo de longitud de onda de 425 a 650 nm el coeficiente de extinción espectral promedio de la microalga *Coelastrella striolata* es prácticamente constante y con los mayores valores, indicando que es donde existe la mayor interacción de las partículas con los fotones. Finalmente, del intervalo de 650 a 680 nm existe un comportamiento monótono decreciente tomando un valor de mínimo aproximado de 0.66 m<sup>2</sup>/g, lo que puede atribuirse a que en esa región no están presentes pigmentos que puedan absorber la energía y entonces permiten que un mayor número de fotones sean transmitidos.

En la Figura 23 también se muestra  $\beta_\lambda^*$  para la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 y para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 reportados por Castillo *et al.* [35] y Berberoglu *et al.* [7], respectivamente. En ambos estudios se encontró que  $\beta_\lambda^*$  era independiente de la concentración de biomasa y moderadamente dependiente de la longitud de onda, a diferencia de lo observado en los resultados de *Coelastrrella striolata*, en que  $\beta_\lambda^*$  es prácticamente independiente de la longitud de onda.

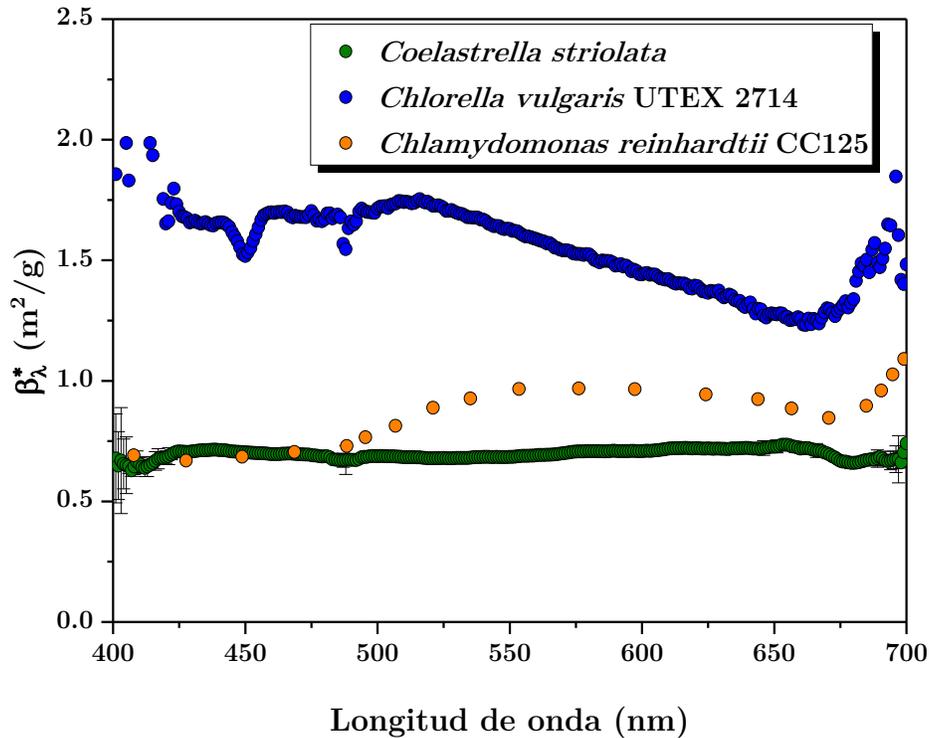


Figura 23. Coeficiente específico de extinción espectral ( $\beta_\lambda^*$ ) de las microalgas *Coelastrrella striolata* (presente estudio), *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 [35] y *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 [7] en suspensión.

En cuanto a los valores del  $\beta_\lambda^*$  de estas dos microalgas en comparación con *Coelastrrella striolata*, se observa que el valor de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 es aproximadamente el doble del valor de *Coelastrrella striolata*, mientras que el valor de *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 es semejante al valor de *Coelastrrella striolata*, esto es debido a que el tamaño de las células de *C. reinhardtii* CC125 ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) es similar al de *Coelastrrella striolata*. Por lo tanto, estos resultados concuerdan con la teoría radiativa que señala que la naturaleza de interacción entre los fotones y las partículas está determinada por el tamaño relativo de las partículas con respecto a la longitud de onda [31].

### 6.2.3 Albedo espectral

La Figura 24 muestra el albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de la microalga *Coelastrella striolata*, determinado experimentalmente con la metodología desarrollada por Castillo *et al.* [35] a una concentración de biomasa (0.016 g/L) en la región PAR (400-700 nm).

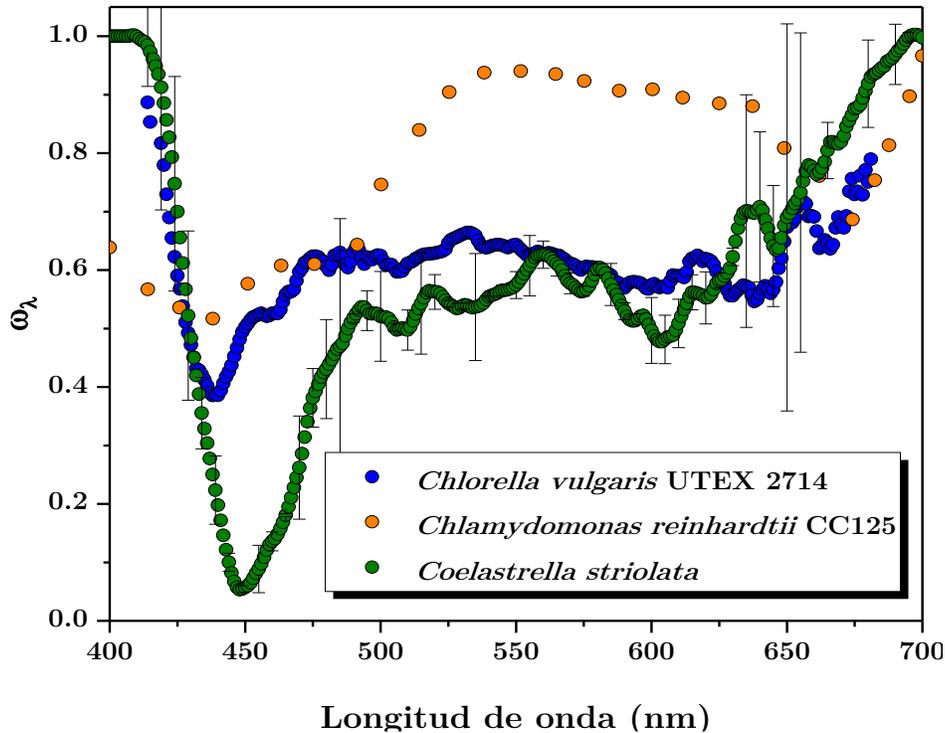


Figura 24. Albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de las microalgas *Coelastrella striolata* (presente estudio), *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 [35] y *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 [7] en suspensión.

En la Figura 24 se puede observar que desde  $\sim 415$  a  $450$  nm el valor espectral del albedo para la microalga *Coelastrella striolata* en suspensión, tiene un comportamiento monótono decreciente de un valor de 0.97 a 0.05 aproximadamente. El fenómeno de absorción predomina en el intervalo de 425 a 450 nm y después de esta longitud de onda el albedo aumentó paulatinamente hasta 0.54, es decir, 54 % de la energía es dispersada. En la región de 500 a 600 nm el fenómeno de dispersión predominó, esto se debe a que en esta zona no existe la presencia de pigmentos absorbentes de energía. Después de los 600 nm el albedo aumenta hasta un valor de 0.7 y presenta un pico de absorción en 650 nm atribuido a la presencia de clorofila b (ver Anexo V).

En la Figura 24 también se muestra el albedo espectral para la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 y para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 reportados por Castillo *et al.* [35] y Berberoglu *et al.* [7], respectivamente.

La Figura 24 muestra que para toda la región PAR la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 el valor del albedo siempre es mayor a 0.5, es decir, que el fenómeno de dispersión domina sobre la absorción, sin embargo, existen picos característicos de absorción de clorofila a en 435 y 675 nm. En cuanto a la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, presenta una zona (415 a 440 nm) donde la absorción predomina sobre la dispersión y posteriormente el valor de albedo incrementa paulatinamente hasta un valor de 0.65 y se mantiene constante en la región de 500 a 625 nm donde no hay interferencia por pigmentos y en consecuencia la dispersión domina sobre la absorción. Finalmente se presentan dos picos de absorción cercanos a 650 y 675 nm correspondientes a la absorción debido a la presencia de clorofila b y clorofila a, respectivamente.

En comparación con los resultados obtenidos de la microalga *Coelastrrella striolata* el albedo tiene un comportamiento similar a la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 y ambas presentan una zona donde la absorción domina sobre la dispersión a diferencia de *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 donde el fenómeno dominante es la dispersión.

#### **6.2.4 Porcentaje de energía dispersada**

En la Figura 25 se muestra el porcentaje de energía dispersada en función de la posición angular a diferentes valores de  $g$  (-0.9 a 0.9 en incrementos de 0.45). Valores de  $g = 0.45$  y  $0.9$  significa dispersión hacia enfrente y valores de  $g = -0.45$  y  $-0.9$ , dispersión hacia atrás. La posición angular correspondiente a  $0^\circ$  representa la posición donde se proyecta el haz de luz emitido por la fuente de luz, mientras que  $180^\circ$  representa la posición en la cual el haz de luz incide en el sistema.

Se puede observar que los datos experimentales obtenidos para *Coelastrrella striolata* (círculos azules) se ajustan a un comportamiento donde predomina la dispersión de energía hacia adelante ( $g = 0.9$ ). Esto concuerda con diversos estudios encontrados en la literatura donde se reportan valores de  $g$  mayores a 0.95 asegurando que este tipo de microalgas dispersan fuertemente energía hacia enfrente [7, 11, 34, 35].

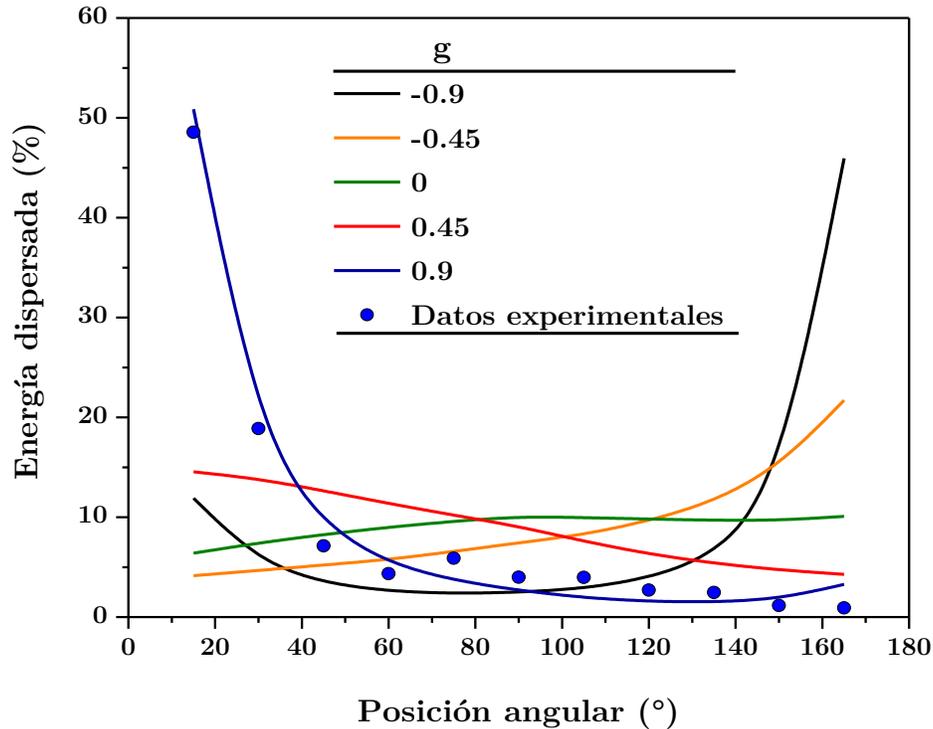


Figura 25. Porcentaje de energía dispersada por el cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* en función de la posición angular a diferentes valores de  $g$ .

### 6.3 Características radiativas de *Coelastrella striolata* en suspensión en diferentes etapas de crecimiento

#### 6.3.1 Coeficiente de extinción promedio

En la Tabla 12 se muestran las condiciones para determinar experimentalmente el coeficiente de extinción específico ( $\beta^*$ ) promedio de la microalga *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento (de acuerdo con la Figura 17). Como se puede observar siempre se trabajó bajo  $\tau \leq 1$ , en que existe una relación lineal entre el albedo ( $\omega$ ) y el porcentaje de energía dispersada ( $\phi$ ) [35].

Las condiciones mostradas en la Tabla 12 para las mediciones de las características radiativas, éstas no dependerán de la concentración de biomasa del cultivo original sino de la composición bioquímica de las células y/o de su tamaño. Sin embargo, respecto al tamaño de las células, como se indicó en la sección 6.1.2, no hubo cambios significativos en función del tiempo.

Tabla 12. Coeficiente de extinción específico promedio de la microalga *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento.

Tiempo (Días)	Etapas de crecimiento	Concentración de biomasa para la determinación de $\bar{\beta}^*$ (g/L)	$\bar{\beta}^*$ (m <sup>2</sup> /g)	Espesor óptico $\tau \leq 1$
0	Adaptación	0.0082 ± 0.0001	0.786 ± 0.028	0.516
5	Exponencial	0.0086 ± 0.0004	0.673 ± 0.031	0.501
10	Exponencial	0.0082 ± 0.0001	0.828 ± 0.032	0.487
15	Exponencial	0.0098 ± 0.0001	0.791 ± 0.032	0.573
20	Exponencial	0.0091 ± 0.0004	0.916 ± 0.032	0.530
25	Estacionaria	0.0096 ± 0.0004	0.973 ± 0.037	0.562
30	Estacionaria	0.0093 ± 0.0001	0.938 ± 0.018	0.544

En la Figura 26 se muestra el coeficiente de extinción específico promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento. Se puede observar que éste no varía significativamente desde el día 0 (etapa de adaptación) hasta el día 15 (etapa exponencial) manteniendo un valor de  $0.802 \pm 0.023$  m<sup>2</sup>/g y a medida que se acerca al estado estacionario  $\bar{\beta}^*$  cambia a un valor de  $0.942 \pm 0.029$  m<sup>2</sup>/g.

De acuerdo con las micrografías ópticas (Figura 19) no existió un cambio significativo en el tamaño de las células, algo similar encontraron Zhao *et al.* [13] para la microalga *Chlorella protothecoides* en que el tamaño de las células no varió apreciablemente con el transcurso del tiempo y seguían una distribución normal. Dado que el coeficiente de extinción es una medida de la probabilidad de que los fotones interactúen con las partículas, se esperaría que el valor del coeficiente de extinción promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) sea mayor en el estado estacionario en comparación con el de la etapa de adaptación, debido a que es donde la concentración de biomasa no cambia y la concentración de células es mayor, lo que aumenta la probabilidad de interacción entre células y fotones.

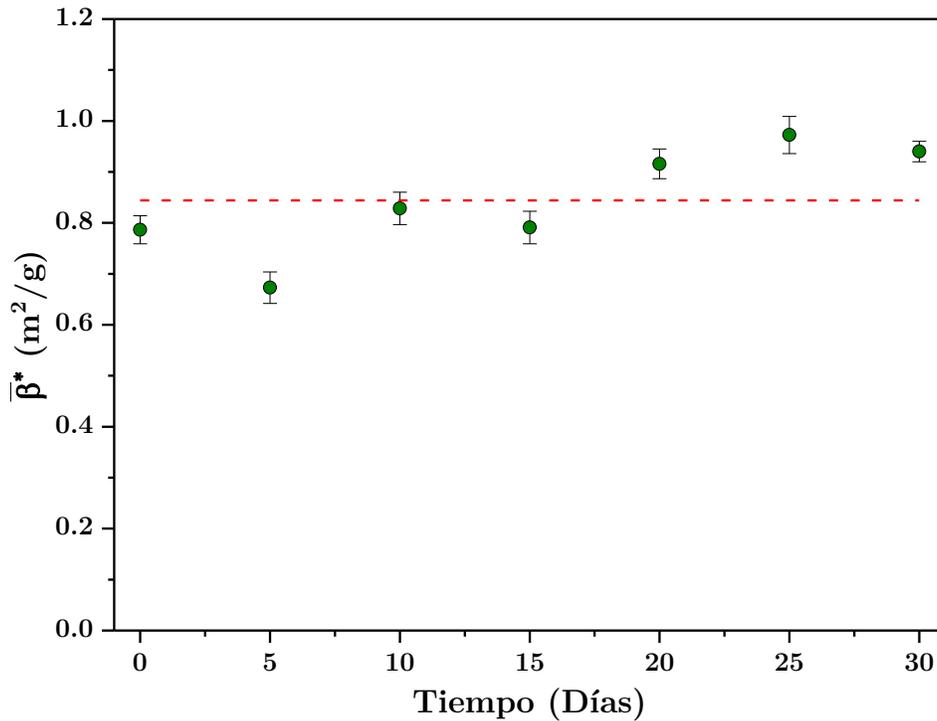


Figura 26. Coeficiente de extinción específico promedio ( $\bar{\beta}^*$ ) de la microalga *Coelastrrella striolata* en función del tiempo.

### 6.3.2 Coeficiente de extinción espectral

En la Figura 27 se muestra el coeficiente de extinción específico espectral ( $\beta_\lambda^*$ ) para la microalga *Coelastrrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento. Se puede observar que del día 0 al día 15 el comportamiento de este coeficiente espectral es similar.

Posteriormente después del día 15 hay un ligero aumento en el coeficiente y se mantiene casi constante hasta el día 30. Además, se puede observar un pico en la longitud de  $\sim 436$  nm que puede ser atribuido a la presencia de clorofila a (ver Figura 27) y después de los 450 nm hasta 650 nm  $\beta_\lambda^*$  se mantiene con variaciones relativamente pequeñas durante su crecimiento.

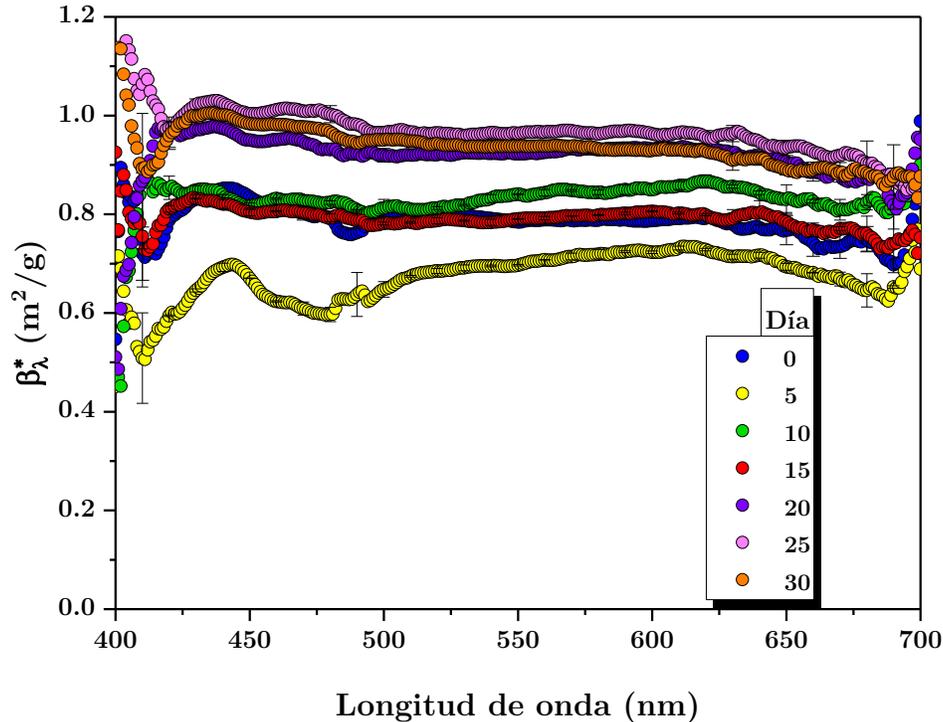


Figura 27. Coeficiente de extinción específico ( $\beta_{\lambda}^*$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* a lo largo de su crecimiento.

### 6.3.3 Albedo espectral

En la Figura 28 muestra el albedo espectral ( $\omega_{\lambda}$ ) determinado experimentalmente de la microalga *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento. Se puede observar que para los días 0 (etapa de adaptación) y 5 (etapa exponencial) existe una zona desde 410 a 436 nm donde el albedo tiene un comportamiento monótono decreciente de un valor de 1 a 0.25. En este mismo intervalo de tiempo (0 a 5 días) existen zonas donde la absorción predomina sobre la dispersión y se puede apreciar un pico de absorción en  $\sim 436$  nm debido a la presencia de clorofila a.

Después del día 15 (etapa exponencial) y hasta el día 30 (etapa estacionaria) se puede apreciar que el albedo toma valores superiores a 0.5 en toda la región PAR, lo que significa que el fenómeno de dispersión dominó sobre la absorción. Esto puede ser atribuido a la composición bioquímica en las células, como se observó en la Figura 21 la mayor concentración de clorofilas se presentó en los días 5 y 10 y a partir del día 15 hubo una disminución en la concentración, por lo tanto, el sistema fotosintético o las células se vuelven menos eficientes para la absorción de energía.

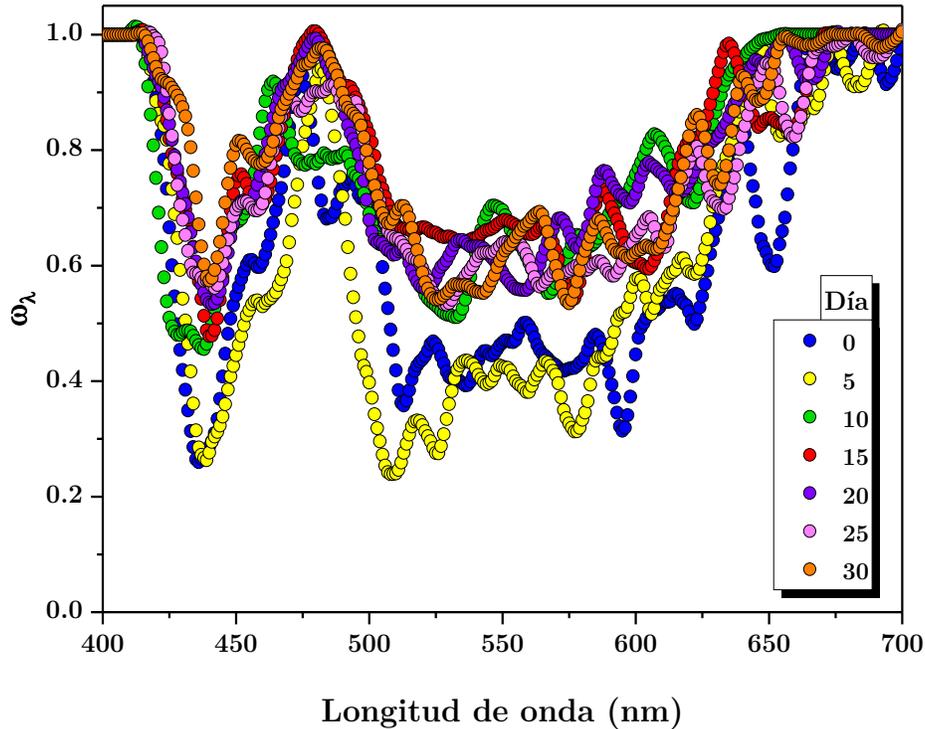


Figura 28. Albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* en suspensión en diferentes etapas de crecimiento.

Para observar el comportamiento del albedo en longitudes de onda donde se encuentran presentes diferentes pigmentos como clorofila a y carotenoides totales se construyó la Figura 29. Se puede observar que las células presentan mayor absorción en los días 0, 5 y 10 presentando valores de albedo de 0.25, 0.3 y 0.46, respectivamente. Esto se puede correlacionar con la concentración de clorofila a mostrada en la Figura 21 donde en estos días existió mayor contenido de clorofilas en las células. Después del día 15 las células presentan menor capacidad de absorción, presentando un valor de albedo mayor a 0.5, es decir, el fenómeno de dispersión domina sobre el de absorción y esto también se puede observar en la Figura 21 donde la concentración de clorofila a se mantiene constante después de 15 días de cultivo.

En cuanto a los carotenoides totales se puede apreciar que el albedo desde el día 0 al día 30 toma valores por encima de 0.6, lo que indica que el fenómeno de dispersión predomina sobre la absorción y comparando la concentración de estos respecto a clorofila, es mucho menor (ver Figura 21), además de que a partir del día 10 no existe una diferencia significativa en la concentración de estos pigmentos.

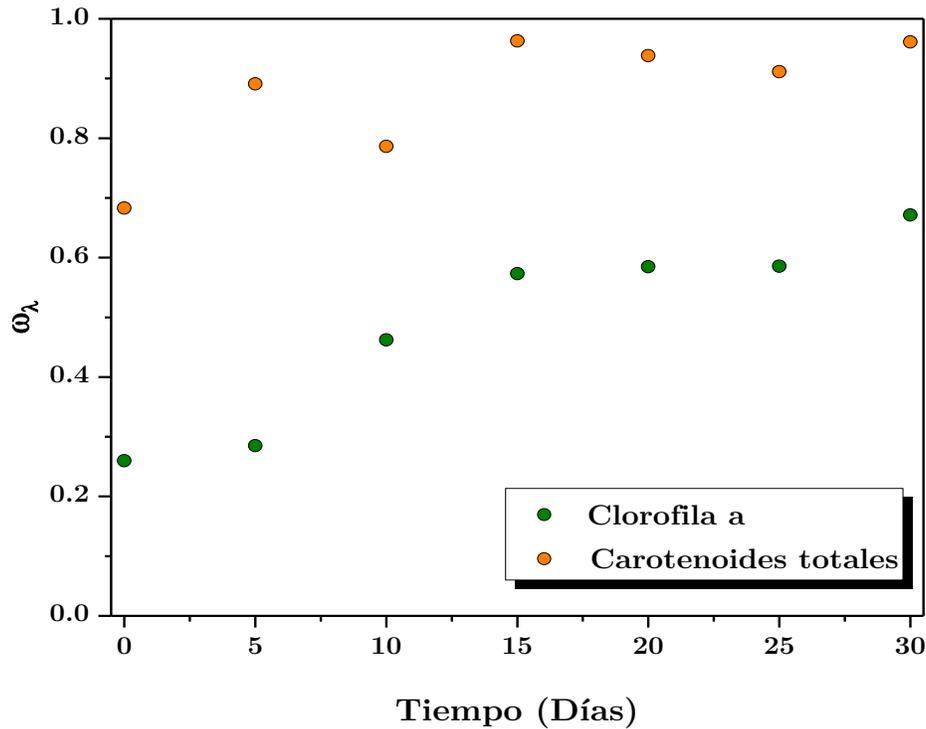


Figura 29. Albedo en función del tiempo para clorofila a (436 nm) y carotenoides totales (485 nm) para la microalga *Coelastrella striolata*.

Zhao *et al.* [13] encontraron un comportamiento similar para las secciones transversales de absorción para tres cepas del género *Chlorella* donde en tiempos cortos, presentan el mayor valor tanto para clorofila a como para carotenoides totales, luego disminuyen con el tiempo y luego se acercan gradualmente a un valor estable durante el crecimiento estacionario.

#### 6.3.4 Porcentaje de energía dispersada

La Figura 30 muestra el porcentaje de energía dispersada en función de la posición angular para diferentes etapas de crecimiento del cultivo de *Coelastrella striolata*. Se puede observar que, para las diferentes etapas de crecimiento, los valores experimentales siempre se ajustaron para un valor de  $g = 0.9$ , es decir, el valor de  $g$  es independiente de la etapa de crecimiento y además existe una dispersión hacia enfrente, lo cual es muy común en estos microorganismos, esta información permitiría decidir dónde colocar el sistema de iluminación en el FBR. La dispersión de energía hacia enfrente permitiría que la luz penetrará más dentro del cultivo y otras células pudieran absorber esta energía.

Varios estudios realizados por distintos autores también han encontrado que el valor de  $g$  siempre es mayor a 0.9 y han encontrado que la dispersión de energía tiende a ser mayor que la eficiencia de absorción por este tipo microorganismos [6, 7, 35].

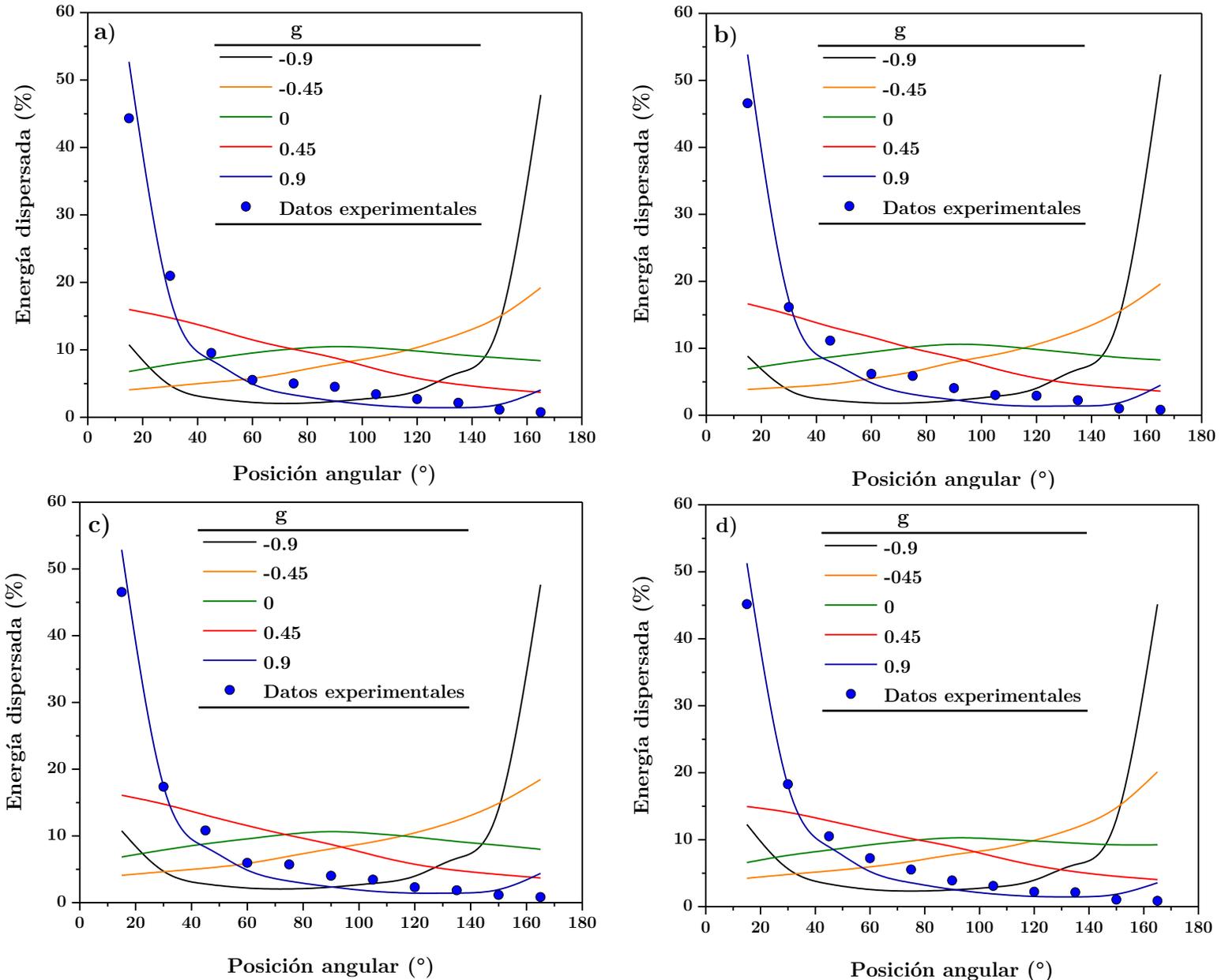


Figura 30. Porcentaje de energía dispersada por el cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* en diferentes etapas de crecimiento en función de la posición angular a diferentes valores de  $g$ . a) Día 0 (Adaptación), b) Día 5 (Exponencial), c) Día 10 (Exponencial) y d) Día 25 (Estacionaria).

## 6.4 Cultivo de *Coelastrella striolata* en condiciones para promover la carotenogénesis (etapa roja)

### 6.4.1 Evolución de la concentración de biomasa

Después de que se logrará el estado estacionario a los 23 días de cultivo (etapa verde), a estos cultivos se les aplicó las condiciones de cultivo mencionadas en la sección 5.6 para promover la carotenogénesis (condiciones para inducir a la síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides secundarios). En la Figura 31 se muestra la evolución de la concentración de biomasa bajo esas condiciones.

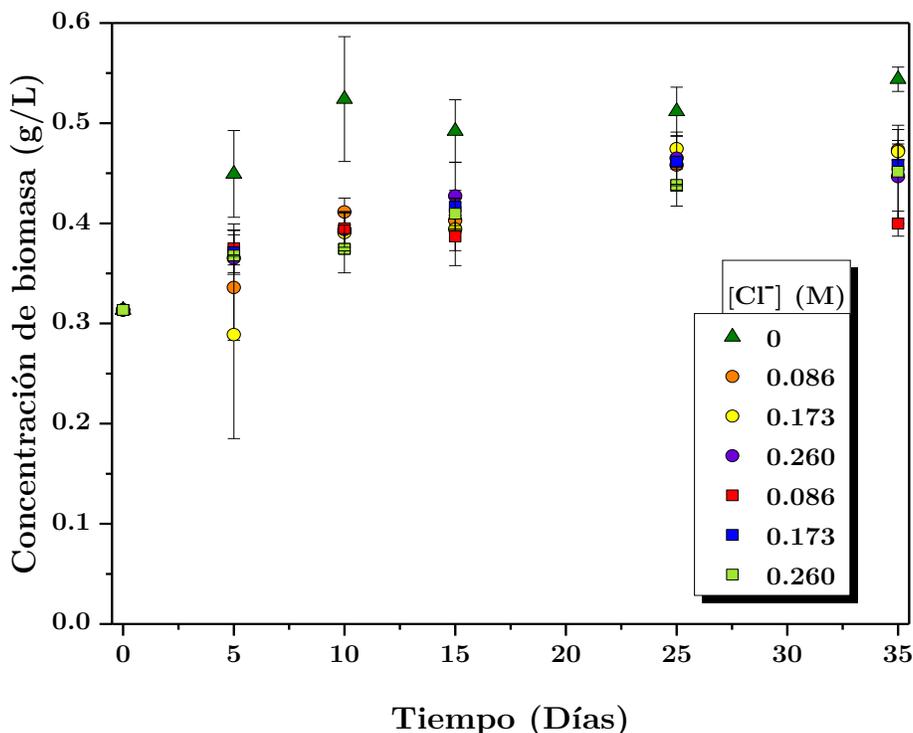


Figura 31. Concentración de biomasa en función del tiempo a diferentes concentraciones de cloruro. (●) NaCl, (■) MgCl<sub>2</sub>.

Todos los cultivos comenzaron con una concentración inicial de  $0.313 \pm 0.004$  g/L, se puede observar en la Figura 31 que para el cultivo sin ningún cloruro añadido al medio de cultivo (triángulos verdes) al día 10 se alcanzó la mayor concentración de biomasa con  $0.524 \pm 0.062$  g/L, después de este día no hubo cambios significativos. Por lo tanto, la concentración biomasa aumentó 1.69 veces la inicial.

Para los cultivos con 0.086, 0.173 y 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M provenientes de NaCl la máxima concentración de biomasa se alcanzó al día 35, 25 y 15, respectivamente. La máxima concentración de biomasa para los cultivos con 0.086, 0.173 y 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M fueron:  $0.473 \pm 0.010$ ,  $0.476 \pm 0.016$  y  $0.427 \pm 0.034$  g/L, respectivamente. Como se puede notar no hubo diferencias significativas en la máxima concentración de biomasa alcanzada en los cultivos con NaCl, solo se alcanzaron en diferentes días. En comparación con la máxima concentración de biomasa alcanzada por el cultivo sin NaCl, esta fue un 14 % mayor.

En cuanto a los cultivos con MgCl<sub>2</sub> todos alcanzaron la máxima concentración de biomasa al día 25. La máxima concentración de biomasa para los cultivos con 0.086, 0.173 y 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M proveniente de MgCl<sub>2</sub> fueron:  $0.434 \pm 0.020$ ,  $0.462 \pm 0.005$  y  $0.438 \pm 0.001$  g/L, respectivamente. Al igual que para los cultivos con NaCl no hubo diferencias significativas en la máxima concentración de biomasa alcanzada. En comparación con la máxima concentración de biomasa alcanzada por el cultivo sin MgCl<sub>2</sub>, esta fue un 17 % mayor.

El aumento de la intensidad luminosa y la adición de cloruros al medio de cultivo no afectó de forma significativa la viabilidad del cultivo.

#### **6.4.2 Micrografías ópticas**

En la Figura 32 se muestran las micrografías del cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* a través del tiempo y en diferentes condiciones de cultivo. En general se puede observar que el cultivo control (sin la adición de cloruros) y los cultivos con NaCl, cambiaron de color a los 15 días de cultivo; se puede apreciar como las células tienen un aspecto amarillo-verde y con morfología diferente a los primeros días de cultivo. En cuanto a los cultivos con MgCl<sub>2</sub> este cambio de coloración y de aspecto se presentó a los 10 días de cultivo, estos cambios en morfología y coloración podría estar asociado con la presencia de diferentes pigmentos en las células.

En la Figura 33 se muestra el tamaño de células en función del tiempo y en diferentes condiciones de cultivo, como se puede observar no hubo cambios significativos a través del tiempo y el tamaño promedio se encontraba en  $\sim 9.69 \pm 0.88$   $\mu\text{m}$ . Se ha reportado que un aumento repentino en la salinidad del medio conduce a la pérdida de agua de la célula debido a la modificación en la presión osmótica, lo cual provoca un encogimiento de la célula [45, 57], sin embargo, este fenómeno no se mostró en el presente estudio.

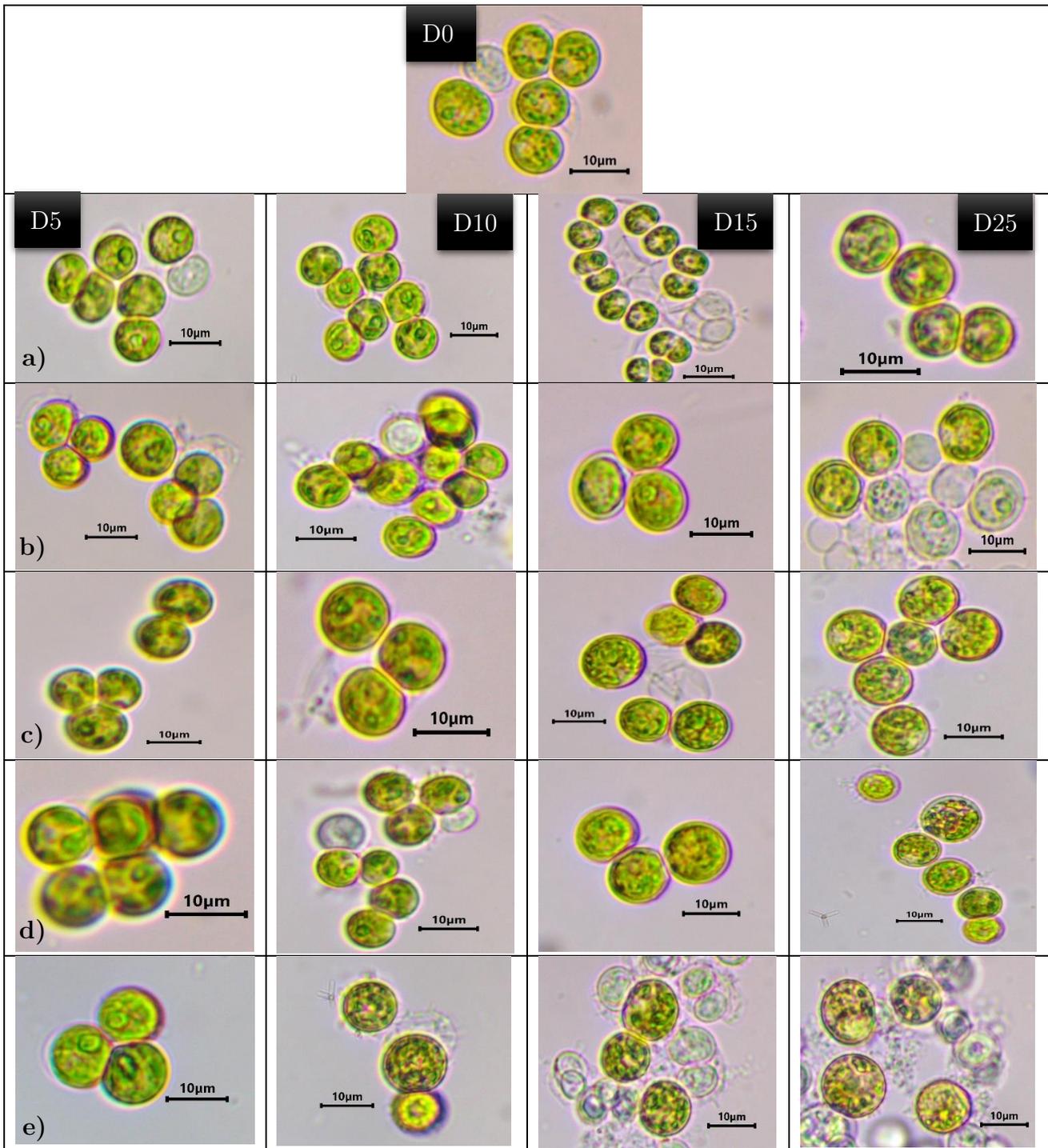
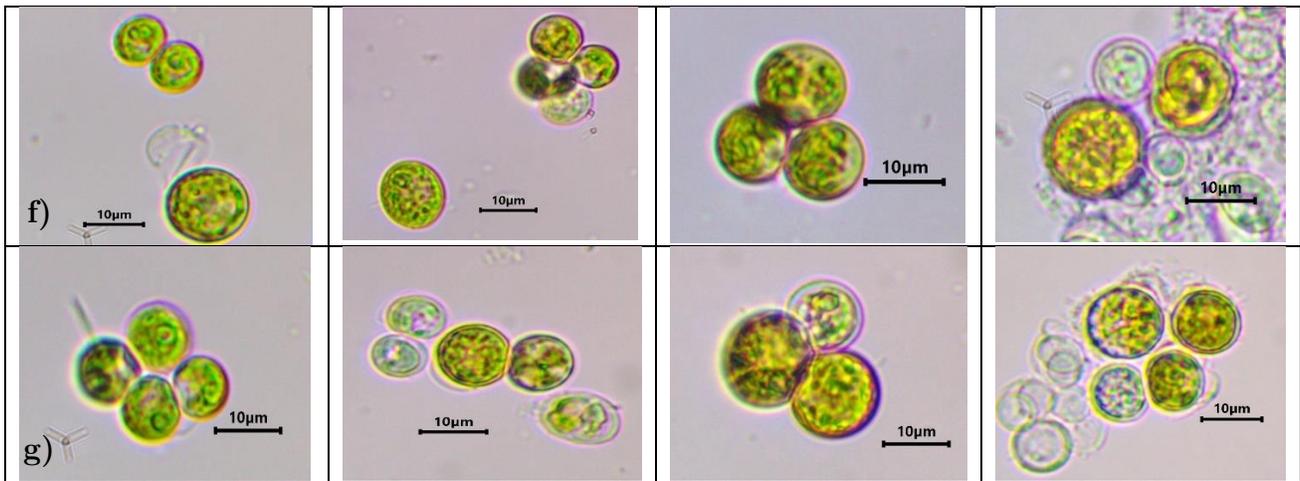


Figura 32. Micrografías ópticas (40X) del cultivo de *Coelastrrella striolata* en función del tiempo y con diferentes concentraciones de cloruros. Control: a), NaCl: b) 0.086 [Cl<sup>-</sup>] M, c) 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M, d) 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M y MgCl<sub>2</sub>: e) 0.086 [Cl<sup>-</sup>] M, f) 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M, g) 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M.



Continuación de la Figura 31. Micrografías ópticas (40X) del cultivo de *Coelastrella striolata*.

En el Anexo VI se muestran los histogramas de distribución del tamaño de células.

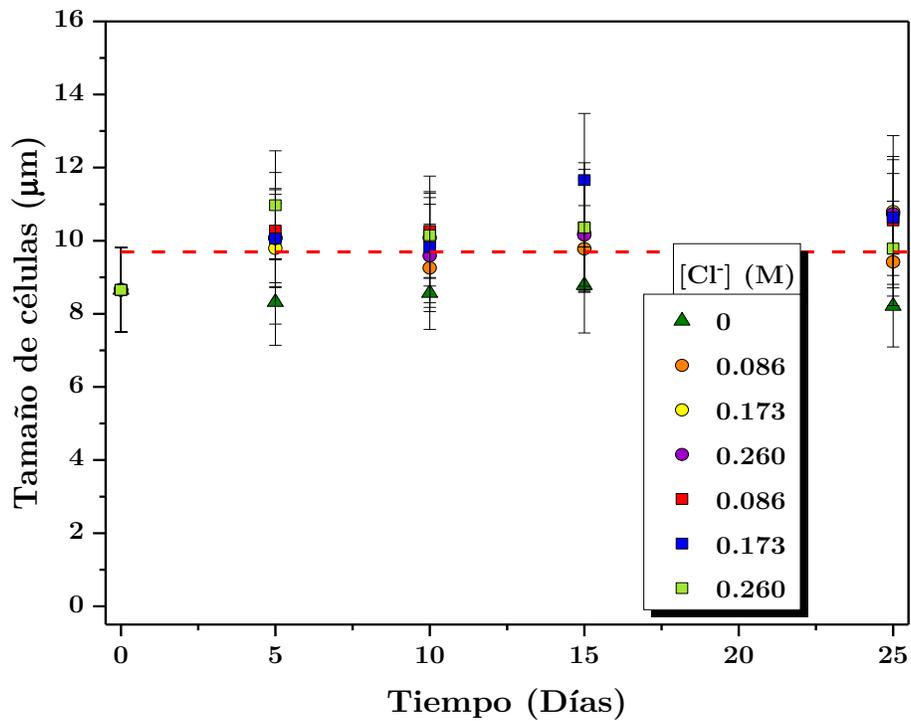


Figura 33. Tamaño de células en función del tiempo a diferentes concentraciones de cloruros. (●) NaCl, (■) MgCl<sub>2</sub>.

### 6.4.3 Identificación de pigmentos en extractos

#### 6.4.3.1 Concentraciones de pigmentos

En la Figura 34 se muestran las concentraciones de pigmentos extraídos de *Coelastrella striolata* a diferentes tiempos y concentraciones de cloruro proveniente de NaCl en el medio de cultivo.

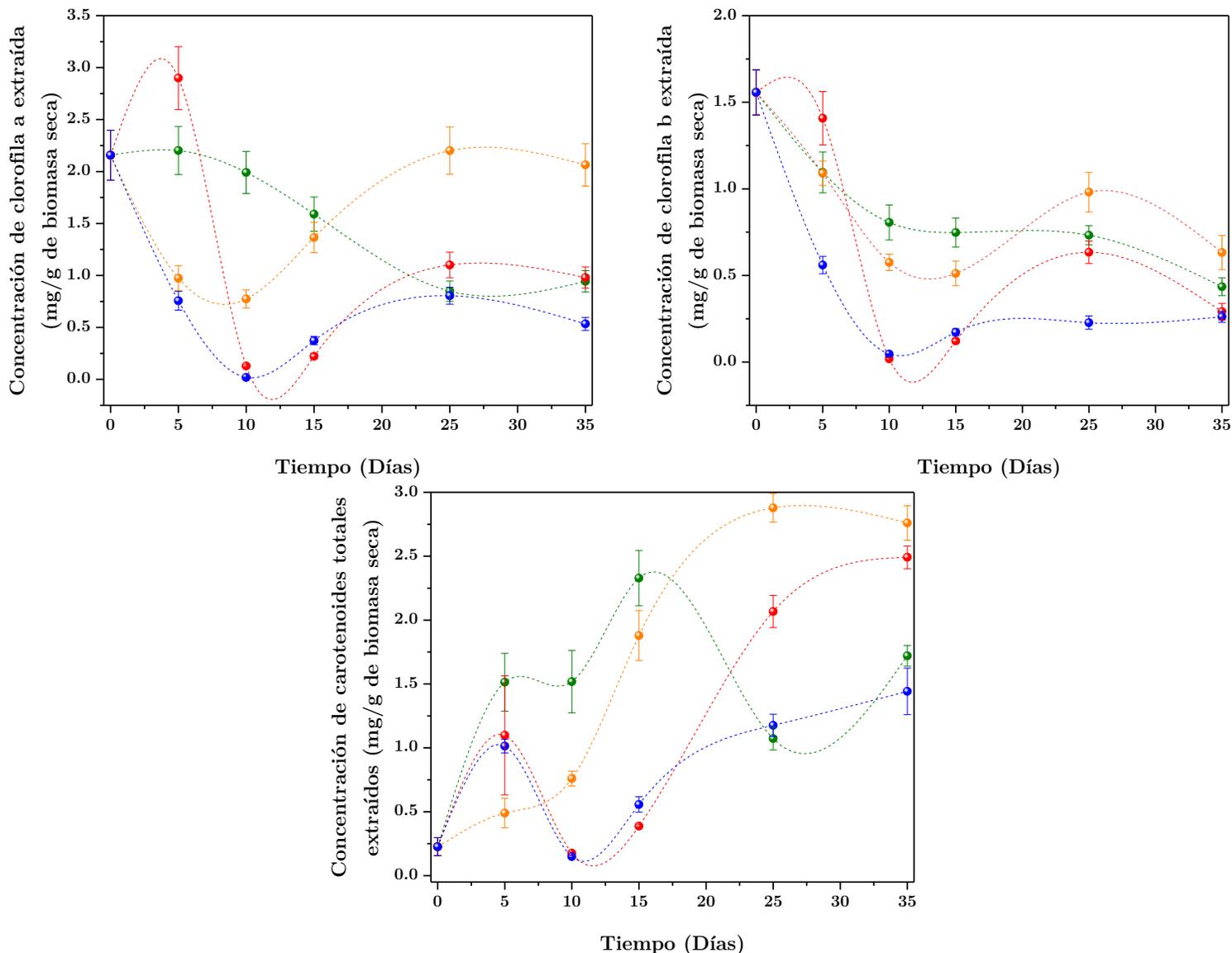


Figura 34. Concentraciones de pigmentos extraídos en *Coelastrella striolata* cultivada con NaCl. (●) 0, (●) 0.086, (●) 0.173 y (●) 0.260 [Cl] M.

En la Figura 34 se puede observar que, al día 0, las concentraciones de clorofilas a y b eran más altas en comparación con los carotenoides totales. La concentración de clorofila a al día 0 fue de  $2.157 \pm 0.211$  mg/g de biomasa seca y ésta se mantuvo durante los primeros 10 días de cultivo para el cultivo control (sin la adición de cloruro). Posteriormente con el paso de los días disminuyó hasta una concentración de  $0.820 \pm 0.122$  mg/g de biomasa seca para el día 25 de cultivo, es decir, la concentración de clorofila disminuyó en un 62 %. En cuanto a la concentración de clorofila b comenzó con  $1.557 \pm 0.109$  mg/g de biomasa seca y disminuyó hasta  $0.428 \pm 0.052$  mg/g de biomasa seca, por lo tanto, hubo una disminución del 73 %. La concentración de carotenoides totales inició con  $0.226 \pm 0.070$  mg/g de biomasa seca, para el cultivo control y alcanzó la máxima concentración al día 15 con  $2.329 \pm 0.216$  mg/g de biomasa seca, es decir que se incrementó  $\sim 10$  veces lo inicial. El incremento gradual en la concentración de carotenoides totales puede deberse a la alta intensidad luminosa ( $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) a la que fue expuesta el cultivo.

Saeki *et al.* [58], precultivaron la cepa de microalga *Coelastrrella* sp. KGU-Y002 a  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  a  $25^\circ\text{C}$  y posteriormente fue transferida a matraces Erlenmeyer manteniendo la misma temperatura del precultivo, pero aumentando la intensidad luminosa a  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  y se combinó con la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, obteniendo una concentración de carotenoides totales de 6.15 mg/g de biomasa seca después de 7 días de cultivo, siendo zeaxantina y luteína los predominantes. Esta concentración de carotenoides fue mayor a la del presente estudio y fue obtenida en menor tiempo, sin embargo, para el cultivo control solo se usó un solo factor de estrés en comparación con el estudio realizado por Saeki *et al.* [58].

Otro estudio similar fue realizado por Aburai *et al.* [29], cultivaron la cepa *Coelastrrella* sp. KGU-H001 bajo una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y una intensidad luminosa de  $214 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  durante 21 días y obtuvieron una concentración de carotenoides totales de  $2.20 \pm 0.08$  mg/g de biomasa seca, es decir, la concentración obtenida fue similar a la del presente estudio y el carotenoide con mayor presencia fue la astaxantina.

De acuerdo con la Figura 34 el cultivo sometido a alta intensidad luminosa y con NaCl a una concentración de 0.086 [Cl] M, alcanzó la concentración máxima de carotenoides al día 25, mientras que con 0.173 y 0.260 [Cl] M se alcanzó hasta el día 35. La concentración máxima de carotenoides totales para los cultivos con 0.086, 0.173 y 0.260 [Cl] M fueron  $2.879 \pm 0.111$ ,  $2.491 \pm 0.089$  y  $1.442 \pm 0.182$  mg/g de biomasa seca, respectivamente.

En comparación con el cultivo control, las concentraciones de carotenoides totales fueron mayores con 0.086 y 0.173 [Cl] M, sin embargo, fueron alcanzadas después de los 15 días de cultivo.

Saeki *et al.* [58], también cultivaron la cepa de microalga *Coelastrrella* sp. KGU-Y002 por 7 días a 25 °C, 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s, deficiencia de nitrógeno y adición de NaCl a 0.15 M (0.15 [Cl] M), obteniendo una concentración de carotenoides totales de  $7.50 \pm 0.34$  mg/g de biomasa seca, predominando la zeaxantina y luteína. Cabe mencionar que, aunque se obtuvo una mayor concentración de carotenoides totales, se realizó la combinación de 3 factores para inducir la carotenogénesis que fueron: alta intensidad luminosa, deficiencia de nitrógeno y adición de NaCl.

En la Figura 35 se muestran las concentraciones de pigmentos extraídos de *Coelastrrella striolata* a diferentes tiempos y concentraciones de cloruro proveniente de  $\text{MgCl}_2$  en el medio de cultivo.

De acuerdo con la Figura 35 el cultivo sometido a alta intensidad luminosa y con  $\text{MgCl}_2$  a 0.086 [Cl] M, alcanzó la concentración máxima de carotenoides al día 5, mientras que con 0.173 y 0.260 [Cl] M se alcanzó hasta el día 15 y 10, respectivamente. La concentración máxima de carotenoides totales para los cultivos con 0.086, 0.173 y 0.260 [Cl] M proveniente de  $\text{MgCl}_2$  fueron  $2.149 \pm 0.871$ ,  $1.206 \pm 0.060$  y  $0.763 \pm 0.033$  mg/g de biomasa seca, respectivamente. En comparación con el cultivo control y con NaCl (0.086 [Cl] M), la mayor concentración de carotenoides totales se obtuvo en menor tiempo con una concentración de 0.086 [Cl] M de  $\text{MgCl}_2$ .

Saeki *et al.* [58], cultivaron la cepa de microalga *Coelastrrella* sp. KGU-Y002 por 7 días a 25 °C, 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s, deficiencia de nitrógeno y adición de  $\text{MgCl}_2$  a 0.15 M (0.30 [Cl] M), obteniendo una concentración de carotenoides totales de  $10.20 \pm 0.71$  mg/g de biomasa seca, predominando la cantaxantina. Sin embargo, también se utilizaron 3 factores que inducen a la carotenogénesis. Aunque Saeki *et al.* [58] utilizaron la misma concentración de sal (0.15 M) tanto de NaCl y  $\text{MgCl}_2$  se obtuvieron diferentes concentraciones de carotenoides totales, pero, en ambos casos predominaron distintos carotenoides. Por lo tanto, la adición de cloruros influye en el metabolismo y síntesis de pigmentos carotenoides y todo dependerá de cual se desea obtener.

El estrés salino provoca varias alteraciones bioquímicas y bioenergéticas, como un aumento de las tasas de biosíntesis de lípidos y una mayor producción de energía y biopolímeros, cambios en la permeabilidad de la membrana con la interrupción de la homeostasis iónica y un nivel elevado de ROS [26].

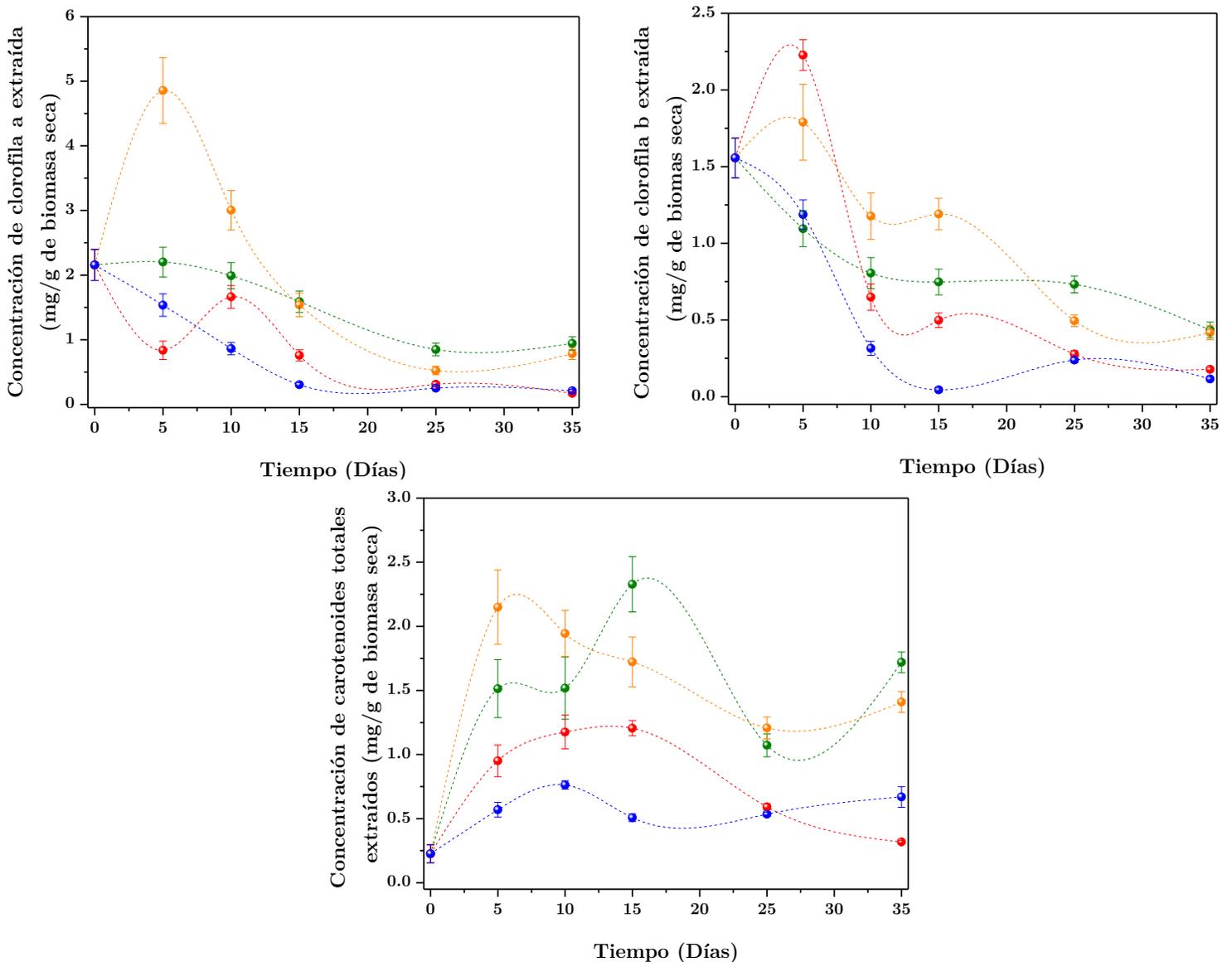


Figura 35. Concentraciones de pigmentos extraídos en *Coelastrella striolata* cultivada con  $MgCl_2$ . (●) 0, (●) 0.086, (●) 0.173 y (●) 0.260  $[Cl^-]$  M.

La salinidad y la alta intensidad luminosa provoca una reducción en la clorofila y limita la tasa de asimilación neta de  $CO_2$ , esto provoca un retraso en el crecimiento celular. También puede estar relacionado con la disminución de la actividad de Rubisco debido a la baja absorción de  $CO_2$  [45]. Por ejemplo, un estudio multiómico para *Chromochloris zofingiensis* demostró que tras la presencia de  $NaCl$  exhibió una regulación a la baja considerable para Rubisco (disminución de más de 15 veces); en consecuencia, se observó una disminución de 3-fosfoglicerato (producto de la carboxilación), indicativo de la atenuación del ciclo de Calvin-Benson.

En este caso, tras el tratamiento con sal, las reacciones de luz se reprimieron severamente, lo que provocó una menor producción de moléculas de ATP y NADPH para la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> [59].

La biosíntesis de carotenoides difiere de una especie a otra; sin embargo, casi todas las especies de plantas o microalgas fotosintéticas (en especial las clorófitas) comparten la ruta metabólica primaria común, como se muestra en la Figura 36 [18, 59, 60].

Todas las vías se inician a partir del mismo bloque de construcción C<sub>5</sub>, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) o su isómero, el difosfato de dimetilalilo (DMAPP), producido a partir de acetilcoenzima A (la vía del ácido mevalónico citosólico (MVA)) o piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (vía cloroplástica del fosfato de metileritritol (MEP)). Se ha sugerido en las algas verdes que la biosíntesis de carotenoides emplea precursores derivados de la vía MEP en lugar de la vía del mevalonato citosólico (MVA) [59].

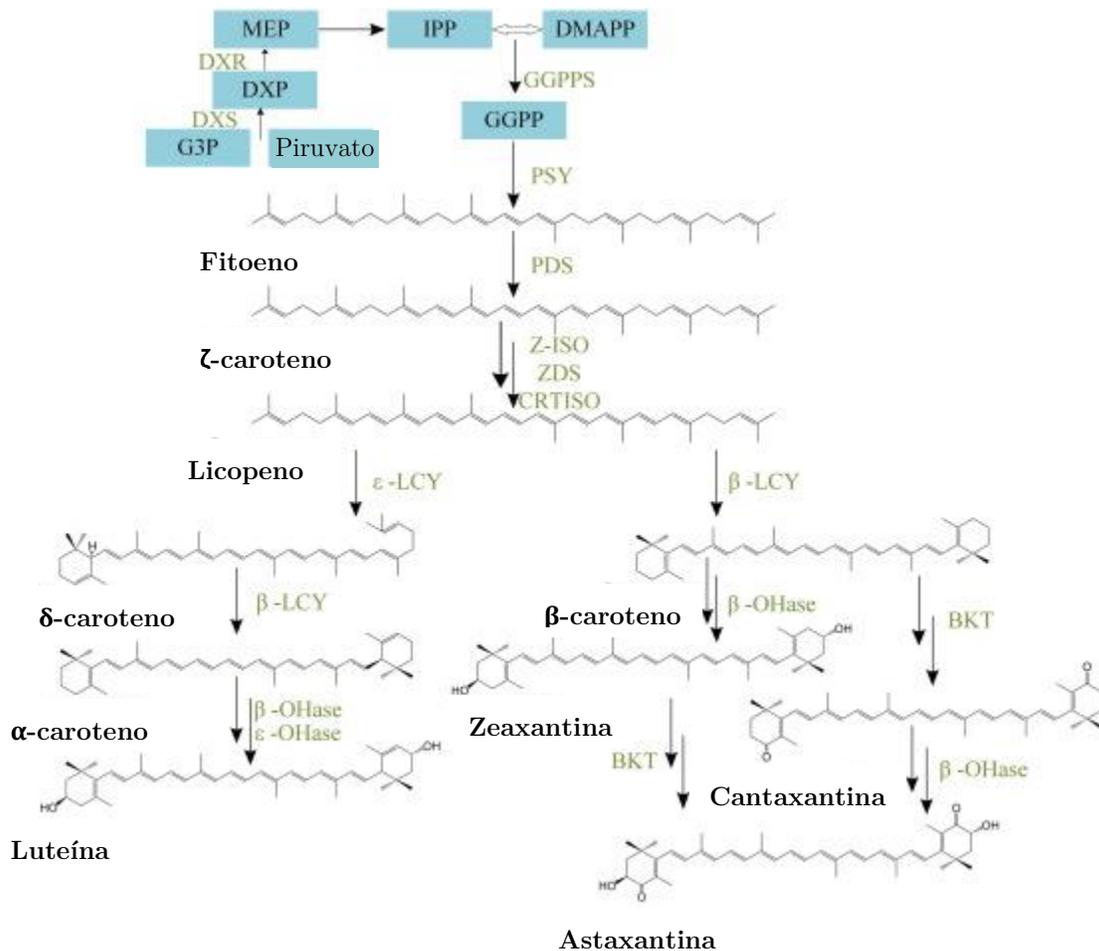


Figura 36. Ruta de biosíntesis de carotenoides en clorófitas [18, 59, 60].

IPP y DMAPP, los componentes básicos de los carotenoides se convierten en geranyl difosfato de 10 carbonos (GPP), seguido de la condensación de dos moléculas de GPP para formar geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). GGPP se condensa aún más en el primer caroteno fitoeno de 40 carbonos, mediado por la fitoeno sintasa (PSY) [59]. El fitoeno incoloro, se somete a cuatro desaturaciones secuenciales catalizadas por fitoeno (PDS) y  $\zeta$ -caroteno (ZDS) desaturasas, lo que resulta en la formación de pro-licopeno, que es isomerizado por una isomerasa específica (CRTISO) a licopeno, el primer carotenoide coloreado [60].

A nivel de licopeno, la vía se divide en dos rutas. La primera ruta da como resultado la formación de  $\alpha$ -caroteno debido a la acción de la licopeno  $\epsilon$ -ciclaza ( $\epsilon$ -LCY) y la licopeno  $\beta$ -ciclaza ( $\beta$ -LCY). Posteriormente la hidroxilación del  $\alpha$ -caroteno es catalizada por la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa ( $\beta$ -OHase) y la  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa ( $\epsilon$ -OHase) para la formación de luteína. En la segunda ruta, el licopeno es ciclado en ambos extremos por la licopeno  $\beta$ -ciclaza ( $\beta$ -LCY), produciendo  $\beta$ -caroteno con dos grupos terminales  $\beta$ -ionona. El  $\beta$ -caroteno como precursor directo, involucra múltiples rutas a través de una serie de pasos de hidroxilación y cetolación mediados por  $\beta$ -caroteno hidroxilasa ( $\beta$ -OHase) y  $\beta$ -caroteno cetolasa (BKT), para la formación de zeaxantina, cantaxantina y astaxantina [60].

El estudio multiómico realizado por Mao *et al.* [59] para *Chromochloris zofingiensis* demostró que la acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  provoca una disminución en el potencial osmótico y, por lo tanto, conduce a una disminución de la cantidad de agua y a un rápido aumento de la concentración de sal dentro del citosol; esto también fue reportado por Elloumi *et al.* [61] para *Scenedesmus* sp. Además, el transporte de electrones fotosintéticos se inactiva de forma reversible después de la contracción del espacio intracelular. Mao *et al.* [59] utilizaron 0.2 M NaCl [59] para someter a estrés a la microalga *Chromochloris zofingiensis* encontrando que la actividad enzimática de la licopeno  $\epsilon$ -ciclaza ( $\epsilon$ -LCY) disminuyó y se estimuló la actividad de la licopeno  $\beta$ -ciclaza ( $\beta$ -LCY) lo que provocó una disminución considerable de luteína.

Saeki *et al.* [58] cultivaron la microalga *Coelastrrella* sp. KGU-Y002 obteniendo una concentración de carotenoides totales de  $7.50 \pm 0.34$  mg /g de biomasa seca con NaCl y  $10.20 \pm 0.71$  mg/ g de biomasa seca con  $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 0.15 M. El carotenoide predominante en el cultivo con NaCl fue la zeaxantina, mientras que en el cultivo con  $\text{MgCl}_2$  predominó la cantaxantina y la zeaxantina, lo que promueve una mayor formación de astaxantina (Figura 36).

El comportamiento descrito en el párrafo anterior podría deberse a que la presencia de  $Mg^{2+}$  no solo es esencial para el crecimiento, sino también funciona como cofactor de algunas enzimas en las rutas metabólicas; que como se puede apreciar en la Figura 36 la mayoría de las rutas para la biosíntesis de carotenoides en microalgas está regulado por distintas enzimas. Un estudio realizado por Urek *et al.* [62] encontraron que los cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$  tienen un efecto estimulante sobre las enzimas que sintetizan carotenoides, además el magnesio se utiliza para modular la ósmosis ambiental, reduce la lisis celular y aumenta la producción de carotenoides, lo cual podría explicar por qué los cambios en el presente estudio son más notables con  $MgCl_2$  que con  $NaCl$ .

Como se discutió en la sección 6.1.4, Lichtenthaler [44] menciona que la relación peso entre clorofila a y clorofila b (a/b) es un indicador de que el pigmento es funcional y de la adaptación a la luz del aparato fotosintético. Es por ello que esta relación debe ser mayor a 1.1 y la disminución de esta relación puede deberse a que las células pueden estar expuestas a una mayor cantidad de luz. Para el cultivo control las cantidades másicas relativas de clorofilas a y b (a/b) durante todo el tiempo de cultivo se mantuvieron en valores superiores a 1.1 y presentando el valor más bajo ( $1.159 \pm 0.188$ ) al día 25 de cultivo.

En cuanto a los cultivos con  $NaCl$ , el valor más bajo de (a/b) se presentó al día 5 de cultivo con 0.086 [Cl<sup>-</sup>] M con un valor de  $0.893 \pm 0.143$  y en medida que transcurrió el tiempo este valor aumentaba; esto nos podría dar la idea de que al inicio las células no se adaptaron fácilmente a la exposición de alta intensidad luminosa y presencia de  $NaCl$  en el medio de cultivo. El cultivo que presentó el valor más bajo de todos los cultivos en presencia de  $NaCl$  fue el de 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M, lo cual nos indica una pérdida o degradación de clorofilas debido a la alta intensidad luminosa y la alta concentración de cloruro.

Los cultivos con  $MgCl_2$ , las cantidades másicas relativas más bajas de clorofilas a y b (a/b) se presentaron a los 25 días para 0.086 y 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M, con valores de  $1.057 \pm 0.042$  y  $1.057 \pm 0.170$ , respectivamente; mientras que para 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M fue al día 5 de cultivo con un valor de  $0.375 \pm 0.071$ . Lo que indica que el cultivo con 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M fue el que le costó más adaptarse a la intensidad luminosa al que fue expuesto y restablecer su homeostasis.

En la Figura 37 se muestran las cantidades másicas relativas de clorofilas (a+b) y carotenoides totales (x+c) y es un indicador del verdor de las células. Esta relación normalmente se encuentra entre 4.2 y 5 para plantas expuestas al sol y entre 5.5 y 7 para plantas expuestas a la sombra. Valores más bajos son un indicador de senescencia (envejecimiento de células), estrés y daño al microorganismo y al aparato fotosintético, que se expresa como una descomposición más rápida de clorofilas que de carotenoides [44].

La cantidad másica relativa de pigmentos para el día 0 se encontraba en un valor de  $16.406 \pm 0.516$  como se puede apreciar en la Figura 37, lo que indica que las células conservan el verdor característico de estos microorganismos. En cuanto a los cultivos con NaCl y para todas las concentraciones de cloruros, las cantidades másicas relativas de pigmentos fue disminuyendo con el paso de los días y fue en el día 15 donde se alcanzaron los valores más bajos; lo cual nos dice que para este día la degradación de clorofilas era mayor que la de carotenoides y este cambio se ve reflejado en la evolución de coloración del cultivo como se aprecia en la Figura 38.

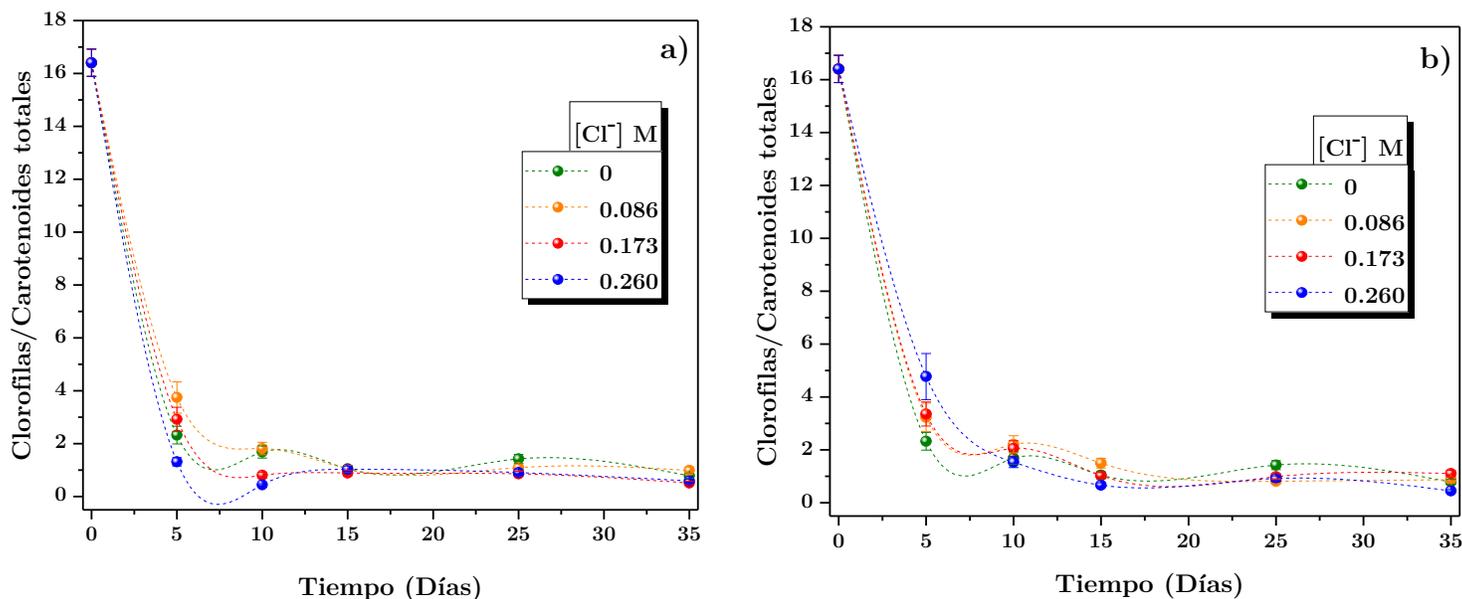


Figura 37. Cantidades másicas relativas de pigmentos. a) NaCl, b) MgCl<sub>2</sub>.

En cuanto a los cultivos con MgCl<sub>2</sub> se puede considerar que el color de los cultivos se comenzó a observar a partir del día 15 (ver Figura 38). De acuerdo con Figura 37, al igual que para los cultivos en NaCl, las cantidades másicas relativas de pigmentos fue disminuyendo con el transcurso del tiempo, pero, los cultivos con 0.086 y 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M presentaron el mínimo valor al día 25 y 15, respectivamente; mientras que el cultivo con 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M lo alcanzó a los 35 días de cultivo.

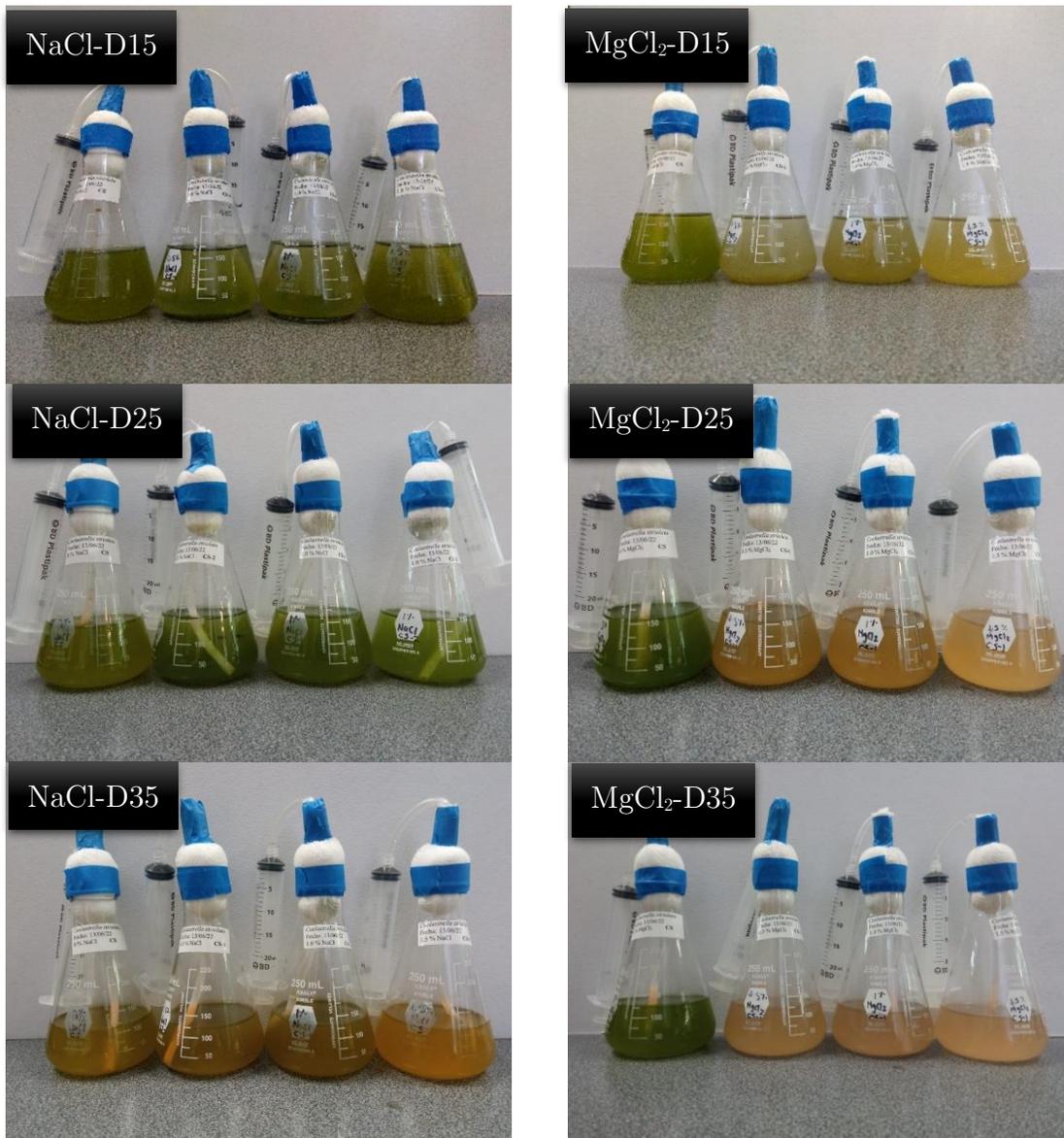


Figura 38. Evolución del color de cultivos de *Coelastrella striolata* a través del tiempo.

La discusión anterior y las imágenes mostradas en la Figura 38, permiten decir que las condiciones de alta intensidad luminosa y la presencia de cloruros en el medio de cultivo favorecieron a la inducción de la carotenogénesis de las células de *Coelastrella striolata*, es decir, se provocó un estrés oxidativo que estimuló la formación de ROS y por ende la síntesis de pigmentos carotenoides y degradación de clorofilas [63, 64].

### 6.4.3.2 Espectros infrarrojos (IR) de extractos

La espectroscopía infrarroja (IR) nos sirve como técnica analítica que nos permite evaluar de forma cualitativa la presencia de grupos funcionales en una molécula, siendo de gran importancia para obtener un primer acercamiento al tipo de pigmentos extraídos y contenidos en las células de la microalga *Coelastrella striolata*. De acuerdo con el estudio realizado por Abe *et al.*, [27] los principales pigmentos que contiene la microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* son clorofila a y b, astaxantina, cantaxantina y  $\beta$ -caroteno; y esto se ha comprobado para cepas del género *Coelastrella* [28, 29]. Es por ello que antes de presentar los espectros IR de los extractos se recopiló información sobre las bandas características de estos pigmentos y los cuales son mostrados en la Tabla 13.

Los espectros presentados en la Figura 39 corresponden a los extractos para el cultivo control. Se puede observar que al día 0 se presenta una señal a  $514\text{ cm}^{-1}$  y después de este día se recorre hasta  $606\text{ cm}^{-1}$ , lo cual de acuerdo con la Tabla 13, indica las vibraciones Mg-N correspondientes a la *clorofila b*. En este espectro también se logra distinguir una banda característica en  $1110\text{ cm}^{-1}$  que, aunque no aparece exactamente en la Tabla 13, Fuentemayor *et al.* [65] menciona que este pico corresponde a las vibraciones de estiramiento C-O de los alcoholes, que probablemente surgen de las xantofilas, como la *astaxantina* y la *cantaxantina* (ver Anexo VII). Las bandas  $1410$  y  $1450\text{ cm}^{-1}$  están asociadas con vibraciones de deformación antisimétrica de los grupos  $\text{CH}_3$  (cambio en los ángulos HCH) y grupos  $\text{CH}_2$  en el  $\beta$ -caroteno. La siguiente banda se presenta en  $1644\text{ cm}^{-1}$  la cual puede ser que provenga del grupo C=O de la *astaxantina* debido a su conjugación a un grupo C=C y también se puede atribuir a la vibración C=C de la *clorofila a*. Otras bandas aparecen en  $2950$  y  $2837\text{ cm}^{-1}$ , se asignan al tramo C-H antisimétrico y simétrico de los grupos  $\text{CH}_2$  en los lípidos y este grupo también está contenido en la estructura del anillo de carbono de la *astaxantina*. Estas bandas también pueden ser asociadas a la vibración de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos C-H,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , de la *clorofila a* y *b*, respectivamente.

De acuerdo con el análisis realizado anteriormente, se puede observar que el extracto del cultivo control de *Coelastrella striolata*, presenta bandas características de *clorofila a* y *b*,  $\beta$ -caroteno y *astaxantina*; lo que nos permite decir cualitativamente que estos pigmentos se encontraban presentes en los extractos obtenidos.

Tabla 13. Bandas características para pigmentos.

<b>Clorofila a</b>			
	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Solvente de extracción	Referencia
CH <sub>3</sub>	2930	Etanol	Chang <i>et al.</i> , 2013 [66]
CH <sub>2</sub>	2817		
C=O	1721		
C-O	1045		
C=C	1644		
<b>Clorofila b</b>			
C=O	1733	Etanol	Shamaei <i>et al.</i> , 2020 [67]
C-H	2852		
Mg-N	593		
C-N	1378		
C-O	1240 y 1051		
<b>β-caroteno</b>			
C=C	1550-1600	Hexano: Acetona	Fuentemayor <i>et al.</i> , 2020 [65]
CH <sub>3</sub>	1450		
C-H	950-980		
<b>Astaxantina</b>			
		DMSO (Dimetilsulfóxido)	Liu <i>et al.</i> , 2016 [68]
C=C	2030		
C-H	2925		
CH <sub>2</sub>	2855		
C=O	1650		
C-O	1075		

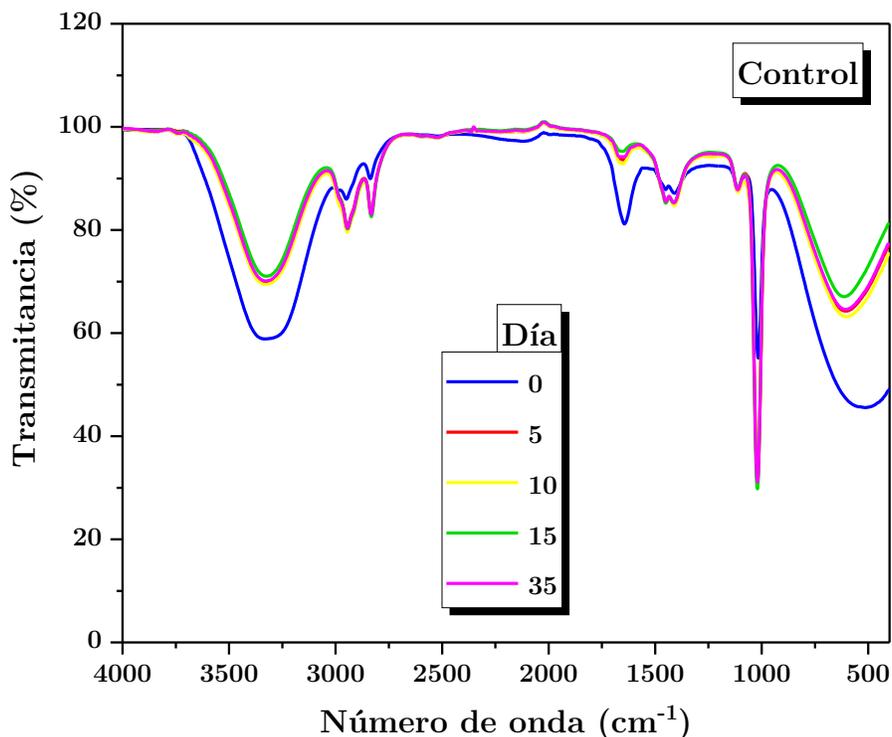


Figura 39. Espectros IR de extractos de pigmentos de *Coelastrella striolata* cultivada sin cloruros.

En la Figura 40 y Figura 41 se muestran los espectros IR para los cultivos con la adición de cloruros al medio de cultivo. Se puede observar que tanto para NaCl y MgCl<sub>2</sub>, las bandas características son las mismas que en el cultivo control; es decir, no existe la aparición de nuevas bandas y lo único en lo que varían son en la intensidad del pico. Por lo tanto, se podría decir que en estos cultivos también se encuentran los mismos pigmentos que para el cultivo control.

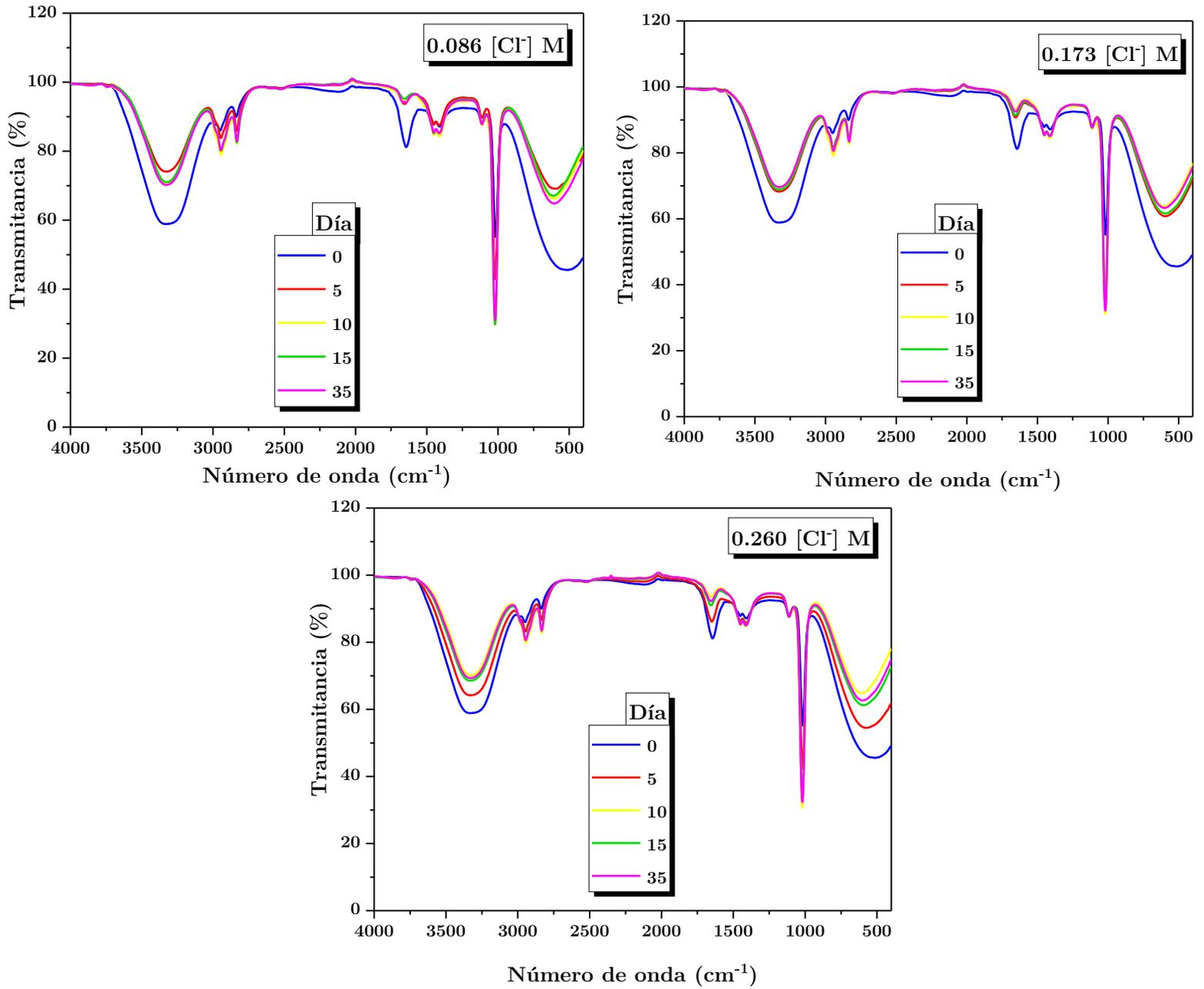


Figura 40. Espectros IR de extractos de pigmentos de *Coelastrella striolata* cultivada con NaCl.

*Características radiativas de la microalga Coelastrella striolata, productora de carotenoides durante diferentes etapas de cultivo*

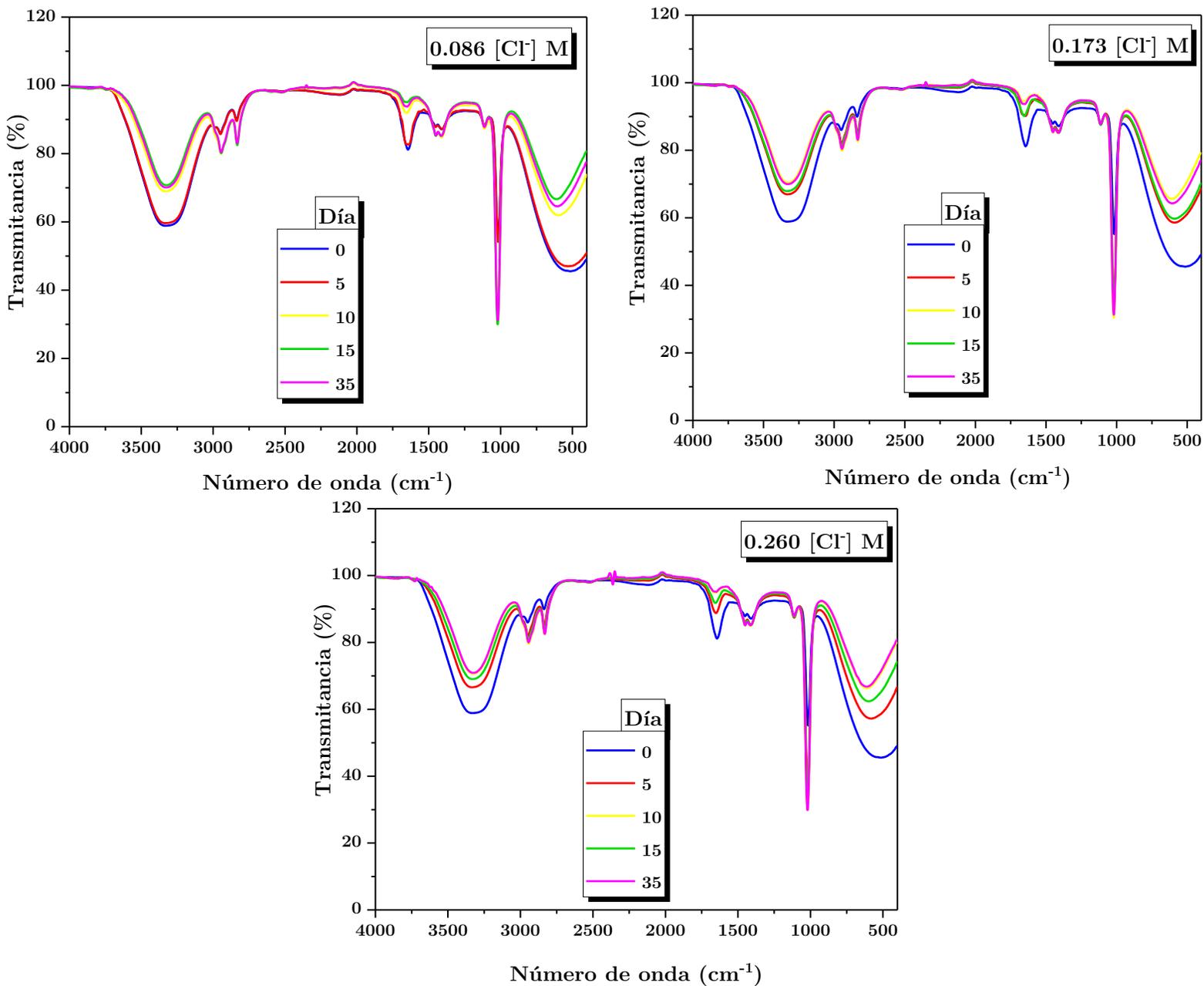


Figura 41. Espectros IR de extractos de pigmentos de *Coelastrella striolata* cultivada con MgCl<sub>2</sub>.

## 6.5 Características radiativas de *Coelastrella striolata* en suspensión en condiciones para promover la carotenogénesis.

### 6.5.1 Coeficiente de extinción específico espectral

El  $\beta_{\lambda}^*$  para el cultivo control de *Coelastrella striolata* se muestra en la Figura 42, como se puede observar que para el día 0 y 5 la tendencia de  $\beta_{\lambda}^*$  es similar para el intervalo de 425 a 675 nm y toma un valor constante de  $\sim 0.744 \pm 0.012 \text{ m}^2/\text{g}$ , además de que esto nos indica que en este intervalo de longitud existe mayor probabilidad de interacción de los fotones con las partículas (en este caso con las células).

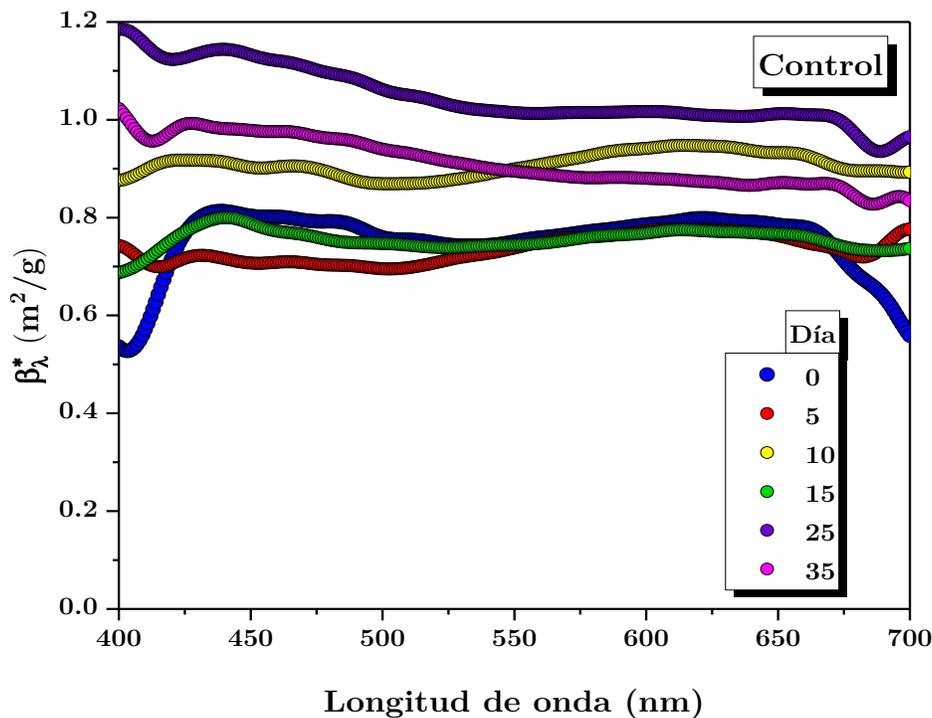


Figura 42. Coeficiente de extinción específico espectral ( $\beta_{\lambda}^*$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* cultivada sin cloruros.

Posteriormente al día 10 de cultivo  $\beta_{\lambda}^*$  se comportó moderadamente dependiente de la longitud de onda e incrementó hasta un valor promedio de  $0.908 \pm 0.024 \text{ m}^2/\text{g}$ , como se mostró en la Figura 33 no existió cambios significativos en el tamaño de células a través del tiempo ni en condiciones para promover la carotenogénesis. La teoría radiativa señala que, al tratarse como partículas grandes con respecto a la longitud de onda, el valor del coeficiente de extinción específico no dependerá fuertemente de la

longitud de onda y se será independiente de la concentración, siempre y cuando el tamaño de la partícula no cambie. Por lo que se podría decir que los cambios en estas propiedades se deben a la composición bioquímica de las células. Por lo tanto, el incremento en  $\beta_{\lambda}^*$  puede deberse a que este día la concentración de carotenoides totales fue mayor en comparación con los días anteriores, por lo que existió también una interacción de los fotones con estos pigmentos; mencionando que los carotenoides además de tener la función captadora de luz también funcionan como fotoprotectores del aparato fotosintético, encargándose de disipar en forma de calor la energía exceso.

Para el día 15 en el cual prevaleció la máxima concentración de carotenoides totales,  $\beta_{\lambda}^*$  disminuyó a un valor similar al del día 0 y día 5, pero la concentración de clorofilas a y b también disminuyó y, por lo tanto, la absorción de energía fue menor. En los días posteriores al día 15, como se mostró en la Figura 34 la concentración de carotenoides totales predominó sobre la concentración de clorofilas; y para el día 25 se alcanzó un  $\beta_{\lambda}^*$  promedio  $\sim 1.048 \pm 0.059$  m<sup>2</sup>/g. Esto pudo deberse a que después de alcanzarse la máxima concentración de carotenoides, la formación de ROS predominó y los carotenoides funcionaron como disipadores de energía; aumentando la dispersión de energía y por ende un aumento de  $\beta_{\lambda}^*$ .

En la Figura 43 se presenta el  $\beta_{\lambda}^*$  para el cultivo de *Coelastrrella striolata* a diferentes concentraciones de cloruros, provenientes de NaCl y MgCl<sub>2</sub>. En cuanto al cultivo con NaCl se puede observar que para 0.173 [Cl] M (Figura 43a) el  $\beta_{\lambda}^*$  no presenta cambios significativos a medida que transcurre el tiempo y mantiene un valor  $\sim 0.770 \pm 0.030$  m<sup>2</sup>/g. Además de que se mostró en la Figura 34 que la concentración máxima para esta concentración de cloruro se obtuvo hasta el día 35 día de cultivo. Mientras que el cultivo con MgCl<sub>2</sub> se puede observar que para 0.173 [Cl] M (Figura 43c) el  $\beta_{\lambda}^*$  si presenta cambios significativos comenzando con un valor promedio de  $\sim 0.752 \pm 0.064$  m<sup>2</sup>/g, después de 5 días incrementó hasta un valor promedio de  $\sim 0.931 \pm 0.073$  m<sup>2</sup>/g y se mantuvo con la misma tendencia hasta el día 25 de cultivo, para posteriormente aumentar hasta un valor promedio de  $\sim 1.107 \pm 0.059$  m<sup>2</sup>/g. Para este cultivo la máxima concentración de carotenoides totales se alcanzó a los 10 días de cultivo y a partir de ahí las concentraciones tanto de clorofilas y carotenoides fue disminuyendo; lo que nos estaría diciendo que el proceso de dispersión de energía es mayor que la absorción debido a esta disminución de contenido de pigmentos y, por lo tanto, provoca el aumento en el valor de  $\beta_{\lambda}^*$ .

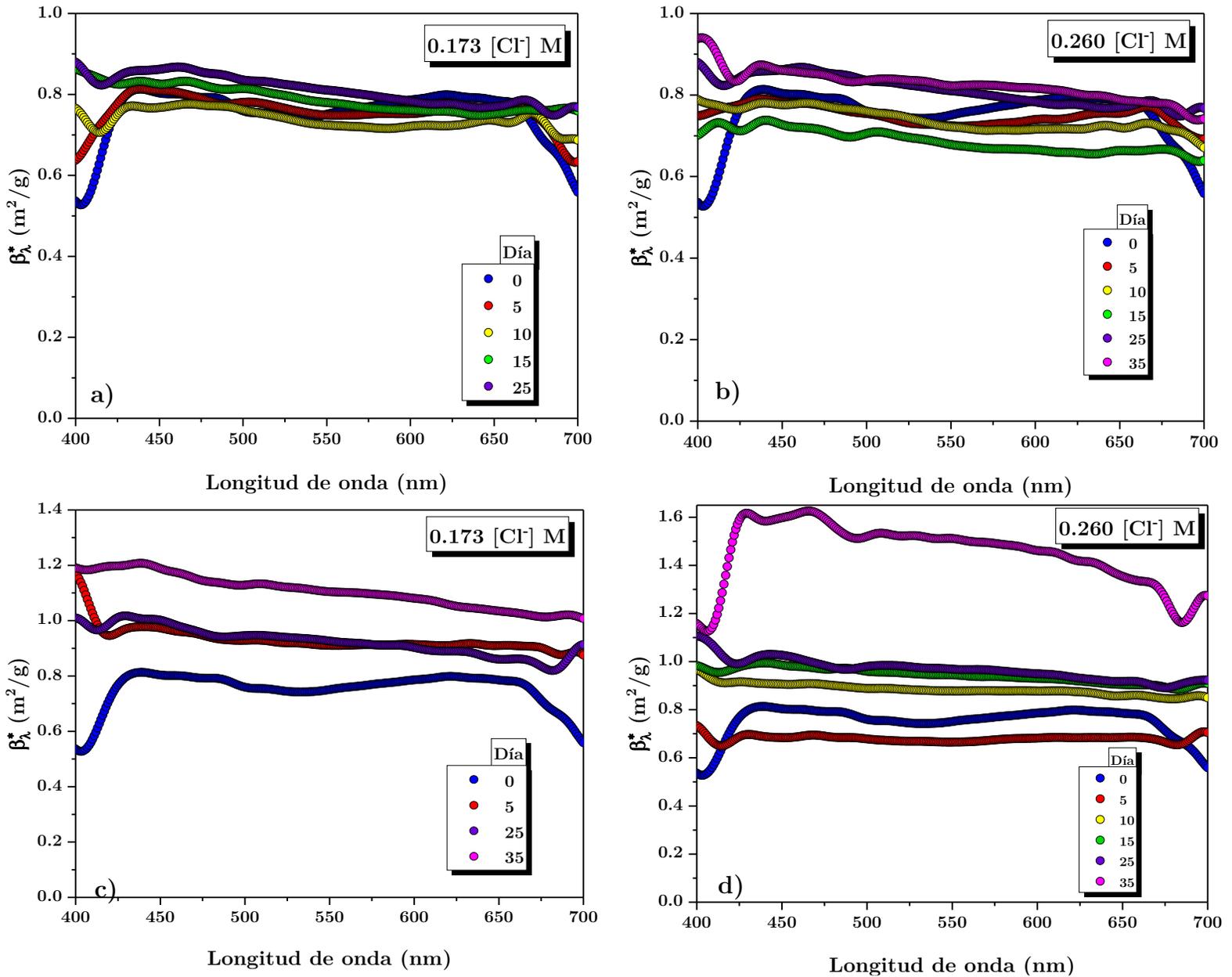


Figura 43. Coeficiente de extinción específico espectral ( $\beta_{\lambda}^*$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* cultivada con cloruros. a) y b) NaCl, c) y d) MgCl<sub>2</sub>.

En la Figura 43 también se muestra el  $\beta_{\lambda}^*$  a una concentración de 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M tanto para NaCl (Figura 43b) como para MgCl<sub>2</sub> (Figura 43d). Se puede observar que para el cultivo con NaCl no existió diferencia significativa durante los primeros 15 días de cultivo y posteriormente hubo un ligero aumento en el  $\beta_{\lambda}^*$  en un intervalo de 425-550 nm, en el cual los pigmentos carotenoides absorben energía y también después del día 15 existió un aumento en la concentración de carotenoides totales.

En cuanto al cultivo con  $\text{MgCl}_2$  a la misma concentración de cloruro (Figura 43d), se puede observar que durante los primeros 5 días de cultivo  $\beta_\lambda^*$  se mantuvo constante en intervalo de longitud de onda de 425-650 nm y con un valor promedio de  $\sim 0.716 \pm 0.052 \text{ m}^2/\text{g}$ . Posteriormente del día 10 al día 25,  $\beta_\lambda^*$  fue aumentando y con la misma tendencia de ser constante en el mismo intervalo antes mencionado y alcanzado un valor promedio de  $\sim 1.452 \pm 0.130 \text{ m}^2/\text{g}$  al día 35 de cultivo. Sin embargo, se puede observar que en 430 y 465 nm se alcanza un valor de  $1.62 \text{ m}^2/\text{g}$  debido a la presencia de clorofila a, clorofila b y carotenoides fotoprotectores. Después de 465 nm existe un comportamiento monótono decreciente hasta 675 nm con un valor de  $1.26 \text{ m}^2/\text{g}$ .

### 6.5.2 Albedo espectral

El albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) para el cultivo control de *Coelastrrella striolata* se muestra en la Figura 44, se puede observar que desde  $\sim 415$  a 440 nm el valor espectral del albedo para la microalga *Coelastrrella striolata* en suspensión, tiene un comportamiento monótono decreciente. Se presenta un pico de absorción a 440 nm atribuido a la presencia de clorofila a, en los primeros 15 días a esta longitud de onda, la absorción domina sobre la dispersión ya que se tienen valores de  $\omega_\lambda < 0.5$ . Posterior al día 15 el valor de albedo espectral aumenta hasta 0.96 y 0.63, para los días 25 y 35, respectivamente; además en estos días la concentración de carotenoides totales dominó sobre la concentración de clorofilas.

En la longitud de onda de  $\sim 480$  nm se encuentran presentes los carotenoides fotoprotectores y fotosintéticos, y se puede apreciar en la Figura 44 que, sin importar el día,  $\omega_\lambda$  toma valores  $> 0.70$ , lo que indica que solo el 30 % de la energía es absorbida.

En la Figura 45 se presenta el  $\omega_\lambda$  para el cultivo de *Coelastrrella striolata* a diferentes concentraciones de cloruros, provenientes de NaCl y  $\text{MgCl}_2$ . El cultivo con NaCl con  $0.173 \text{ [Cl]} \text{ M}$  (Figura 45a) al igual que el cultivo control el  $\omega_\lambda$  presenta un comportamiento monótono decreciente desde  $\sim 415$  a 440 nm. Sin embargo, a la longitud de onda de 440 nm donde absorbe la clorofila a los valores de  $\omega_\lambda$  se mantienen por debajo de 0.47, lo que indica que la absorción dominó sobre la dispersión y esto concuerda en que las mayores concentraciones de carotenoides totales se alcanzaron hasta el día 25 de cultivo, en el cual se favoreció la carotenogénesis. Mientras que en la longitud de onda donde aparecen los carotenoides fotoprotectores y fotosintéticos no hubo cambios significativos en los valores de  $\omega_\lambda$  manteniéndose alrededor de 0.9.

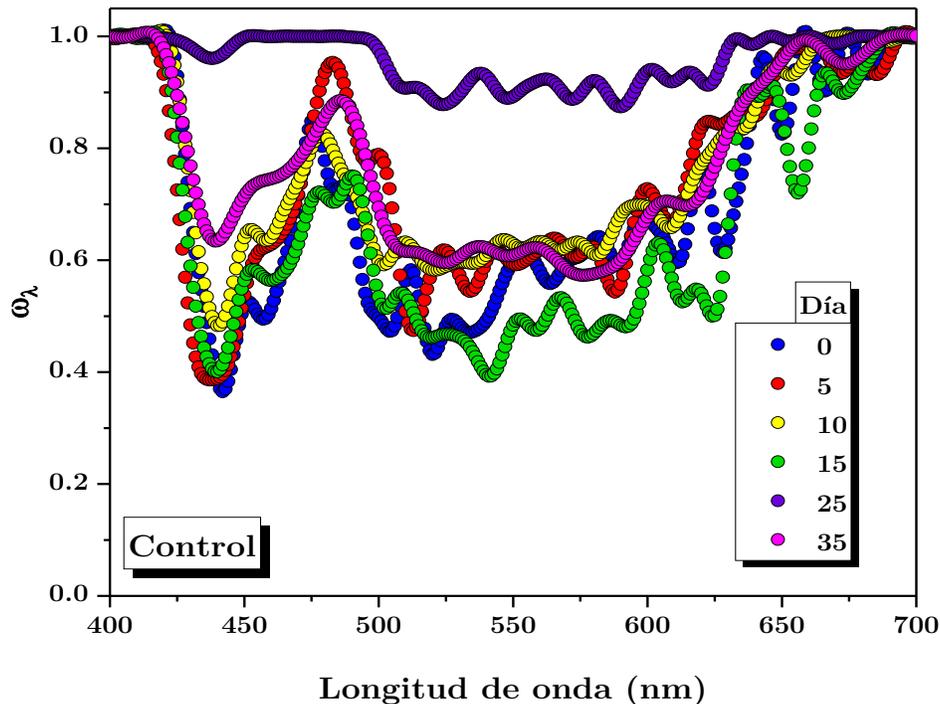


Figura 44. Albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* cultivada sin la presencia de cloruros.

Para el cultivo con 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M (Figura 45b) se puede observar un comportamiento de  $\omega_\lambda$  similar que para el cultivo control en la zona de 415-440 nm. El fenómeno de dispersión dominó sobre la absorción en los primeros 15 días de cultivo, a una longitud de onda de 440 nm donde se atribuye la presencia de clorofila a, y al día 25 de cultivo el valor de  $\omega_\lambda$  tomó un valor de 0.54, mismo día en el cual comenzó a aumentar la concentración de carotenoides totales y se comenzó una degradación de clorofilas. Aunque se puede observar que a una longitud de onda de 480 nm no hubo diferencias significativas en el valor de  $\omega_\lambda$  y tomó valores de alrededor de 0.9. En el intervalo de longitud de onda de 500-600 nm se puede observar que el comportamiento similar para todos los días, debido a que no existe la presencia de pigmentos absorbentes de luz.

La Figura 45 también presenta el  $\omega_\lambda$  para los cultivos con MgCl<sub>2</sub>, para una concentración de 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M (Figura 45c). La mayor absorción se presentó a una longitud de onda de 440 nm debido a la clorofila a con un valor de  $\omega_\lambda$  igual a 0.38 para el día 0 y después del día 5 incrementó hasta un valor de ~0.60. Para este día la concentración de carotenoides totales fue incrementando, presentando su valor máximo en el día 15.

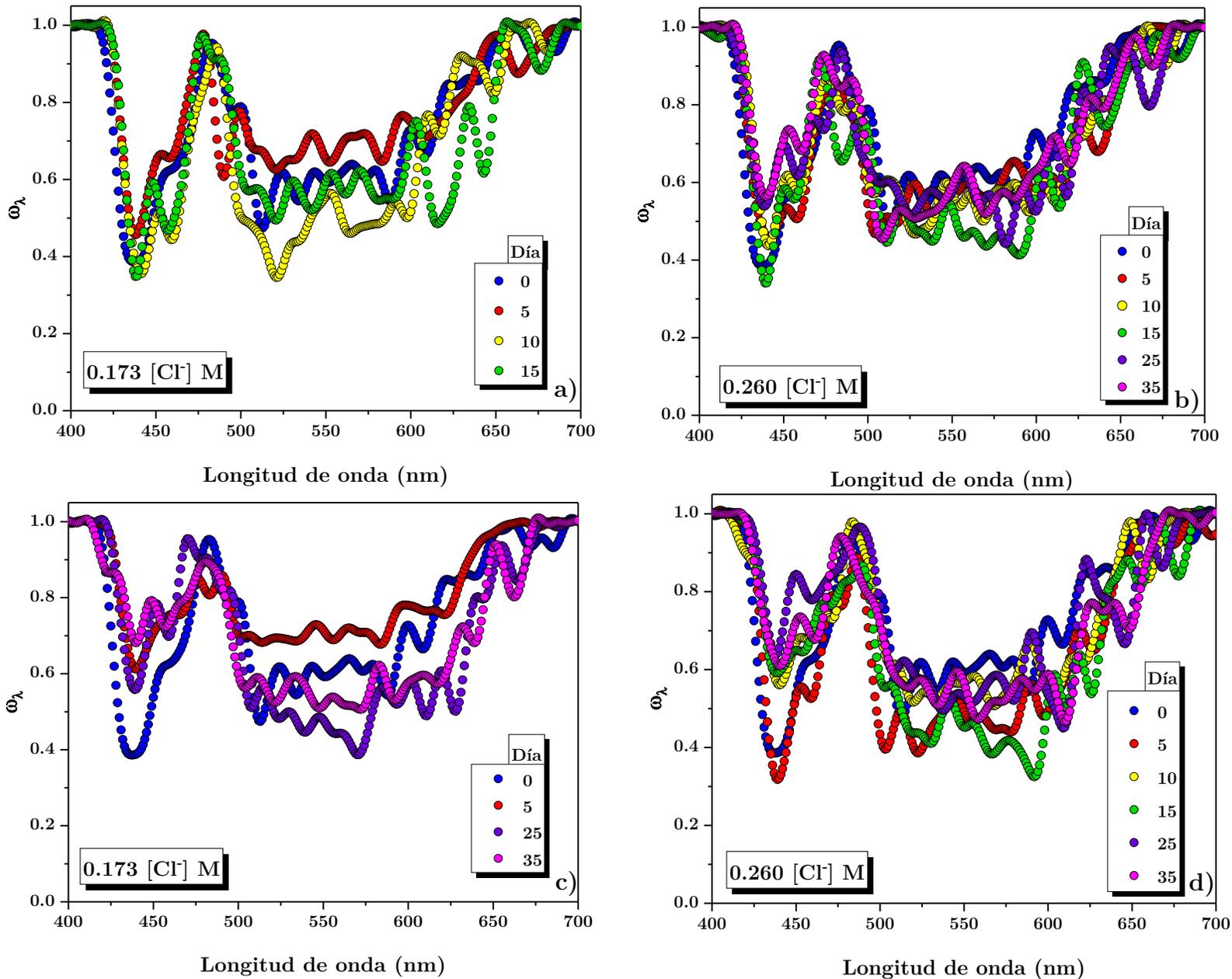


Figura 45. Albedo espectral ( $\omega_\lambda$ ) de la microalga *Coelastrella striolata* cultivada con cloruros. a) y b) NaCl, c) y d) MgCl<sub>2</sub>.

En cuanto al cultivo con 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M (Figura 45d) al igual que el cultivo con 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M, la mayor absorción a una longitud de onda de 440 nm por la presencia de clorofila a se presentó en los primeros cinco días de cultivo y posteriormente a este día el valor de  $\omega_\lambda$  se incrementó hasta un valor de 0.60; lo cual puede estar asociado que a partir del día 10 la concentración de carotenoides totales era mayor que la de clorofila a.

### 6.5.3 Porcentaje de energía dispersada

En la Figura 46 se muestra el porcentaje de energía dispersada en función de la posición angular a diferentes valores de  $g$  (-0.9 a 0.9 en incrementos de 0.45) para el cultivo control (alta intensidad luminosa y sin la presencia de cloruros).

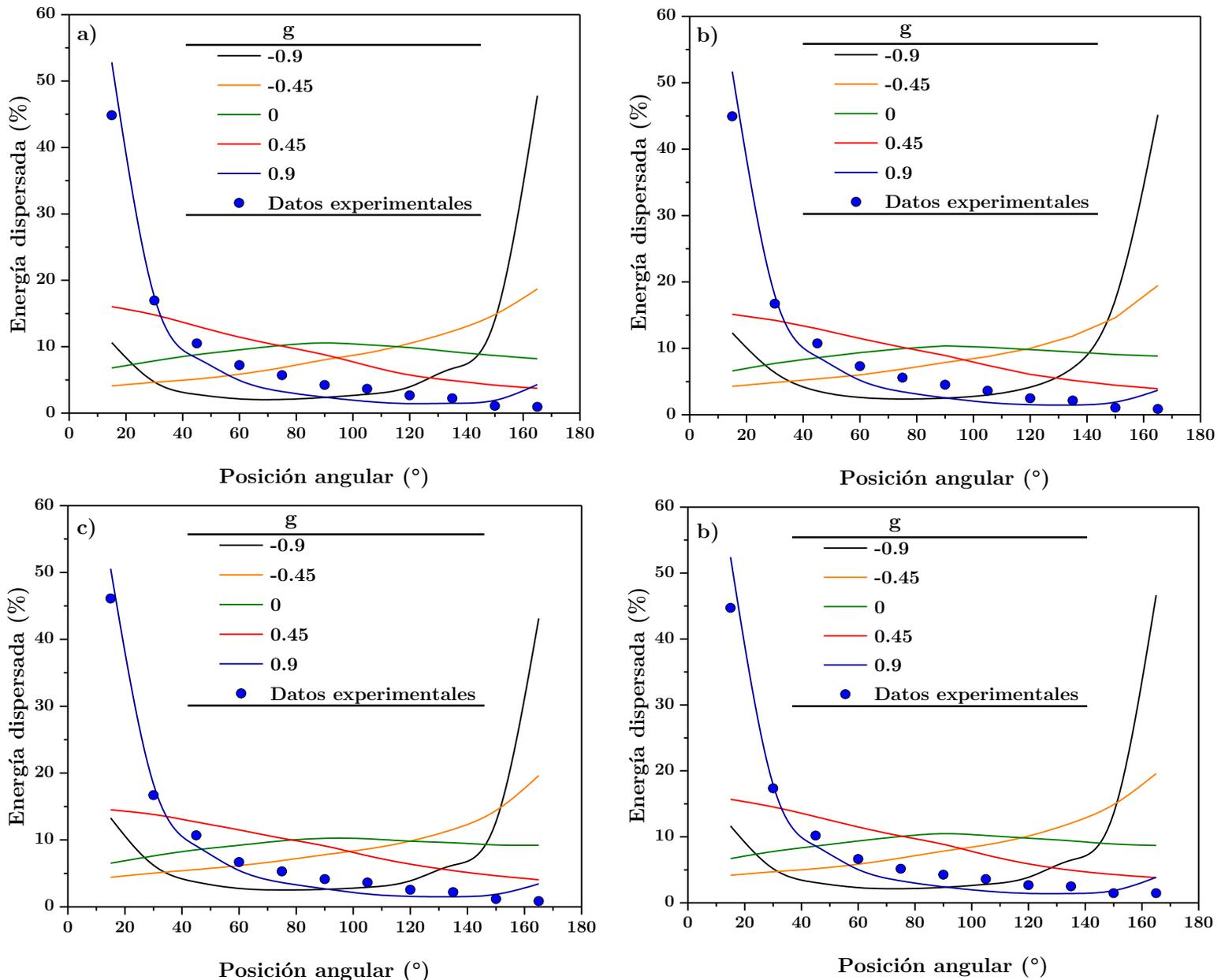


Figura 46. Porcentaje de energía dispersada por el cultivo microalgal de *Coelastrella striolata* sin cloruros en función de la posición angular a diferentes valores de  $g$ . a) Día 0, b) Día 5, c) Día 10 y d) Día 15.

Valores de  $g = 0.45$  y  $0.9$  significa dispersión hacia enfrente y valores de  $g = -0.45$  y  $-0.9$ , dispersión hacia atrás. La posición angular correspondiente a  $0^\circ$  representa la posición donde se proyecta el haz de luz emitido por la fuente de luz, mientras que  $180^\circ$  representa la posición en la cual el haz de luz incide en el sistema.

Se puede observar que los datos experimentales obtenidos para *Coelastrrella striolata* (círculos azules) se ajustan a un comportamiento donde predomina la dispersión de energía hacia adelante ( $g = 0.9$ ). Esto concuerda con diversos estudios encontrados en la literatura donde se reportan valores de  $g$  mayores a  $0.95$  asegurando que este tipo de microalgas dispersan fuertemente energía hacia enfrente [7, 11, 35]. Además, las condiciones para promover la carotenogénesis no tuvo un impacto en el parámetro de asimetría ( $g$ ) de la función fase, por lo tanto, este es independiente de las condiciones de cultivo.

## Capítulo 7

### 7 CONCLUSIONES

---

Uno de los objetivos principales del presente proyecto de investigación fue determinar las características radiativas en diferentes etapas de crecimiento y condiciones de cultivo para la microalga *Coelastrrella striolata*, lo cual se logró a través de la metodología desarrollada por *Castillo et al.*, 2020.

Respecto a las características radiativas para el cultivo en condiciones de conservación de *Coelastrrella striolata* en la región PAR (400-700 nm), se comprobó que el coeficiente de extinción específico promedio con un valor de  $0.698 \pm 0.007 \text{ m}^2/\text{g}$  es independiente de la concentración de biomasa y de la longitud de onda, lo cual es congruente con lo que describe la teoría radiativa.

Esta misma metodología permitió determinar las características radiativas en diferentes etapas de crecimiento. Para ello se logró determinar la curva de crecimiento de la microalga *Coelastrrella striolata* durante 30 días, alcanzando el estado estacionario a los  $\sim 23$  días. Se realizó el ajuste de la curva de crecimiento a partir de modelos primarios: Gompertz y logístico, ambos describen más del 90 % de los datos experimentales, sin embargo, la  $\mu$  ( $0.195 \pm 0.023 \text{ d}^{-1}$ ) obtenida por el modelo logístico es similar a la reportada por la literatura ( $0.22 \text{ d}^{-1}$ ) para microalgas del género *Coelastrrella*. Las micrografías ópticas permitieron observar que el tamaño de las células no cambió apreciablemente durante su crecimiento. En cuanto a las concentraciones de pigmentos (clorofilas y carotenoides totales) se observó que la mayor cantidad se presentó en los primeros días y fue disminuyendo a medida que se alcanzaba el estado estacionario y después de los 10 días de cultivo, no hubo diferencia significativa en estas concentraciones; esto podría atribuirse a que las células no se mantenían en suspensión dentro del FBR lo que limitó la absorción de nutrientes y  $\text{CO}_2$ . Además, las cantidades máxicas relativas de clorofilas a y b (a/b) y carotenoides totales (a+b/c+x) se mantuvieron por arriba de valores de 1.1 lo cual significó que no hubo daño en el aparato fotosintético y la disminución en sus concentraciones fue debida a la división celular.

Se encontró que tanto el coeficiente de extinción promedio y el albedo dependen de la etapa de crecimiento y ambos aumentan a medida que se alcanza el estado estacionario. Asimismo, el albedo se correlacionó con la presencia de diferentes pigmentos como

clorofilas y carotenoides presentes en las células, donde la concentración de estos fue mayor en la etapa adaptación y exponencial. Y a medida que las microalgas se acercaban al estado estacionario de crecimiento, las concentraciones de pigmentos disminuyeron, por lo tanto, el sistema fotosintético o las células se vuelven menos eficientes para la absorción de energía y por ende el fenómeno de dispersión domina sobre la absorción. También se encontró que el parámetro de asimetría ( $g$ ) es independiente de la etapa de crecimiento, con un valor de  $g$  de 0.9, lo que describe que las células de *Coelastrrella striolata* dispersan la energía hacia enfrente, lo cual es frecuentemente reportado en la literatura.

Las células de *Coelastrrella striolata* fueron sometidas a condiciones de cultivo para promover la carotenogénesis (intensidad luminosa de 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  y 0.086, 0.173 y 0.260  $[\text{Cl}^-]$  M, provenientes de NaCl y  $\text{MgCl}_2$ ). Se encontró que estas condiciones no comprometieron la viabilidad del cultivo, y que además no existió un cambio significativo en el tamaño de las células, manteniéndose en un tamaño promedio de  $\sim 9.69 \pm 0.88 \mu\text{m}$ . Los cultivos bajo una alta intensidad luminosa y con NaCl (0.086  $[\text{Cl}^-]$  M) se obtuvo la mayor concentración de carotenoides totales ( $2.879 \pm 0.111 \text{ mg/g}$  de biomasa seca) al día 25 de cultivo. Mientras que para el cultivo con  $\text{MgCl}_2$ , la mayor concentración de carotenoides totales ( $2.149 \pm 0.871 \text{ mg/g}$  de biomasa seca) se obtuvo con 0.086  $[\text{Cl}^-]$  M al día 5 de cultivo. En contraste con el cultivo control que no tenía ningún cloruro añadido, la mayor concentración de carotenoides totales ( $2.329 \pm 0.216 \text{ mg/g}$  de biomasa seca) fue al día 15 de cultivo. Aunque todas las concentraciones están en el mismo orden de magnitud, con  $\text{MgCl}_2$  se obtiene la mayor concentración de carotenoides totales en menor tiempo en comparación con el cultivo control y con NaCl, esto podría atribuirse a que los cationes divalentes como  $\text{Mg}^{2+}$  estimula la actividad enzimática en la biosíntesis de carotenoides.

Los espectros IR de los extractos obtenidos permitieron un primer acercamiento al tipo de pigmentos carotenoides presentes en las células de *Coelastrrella striolata*, estos presentaron bandas características de la astaxantina y  $\beta$ -caroteno; los cuales son reportados para cepas del género *Coelastrrella*; además de cantaxantina.

Las características radiativas de los cultivos en condiciones para promover la carotenogénesis, el cambio en la tendencia de estas propiedades espectrales fue más marcado por los cultivos con  $\text{MgCl}_2$  y menos marcados para NaCl. Sin embargo, la presencia de pigmentos carotenoides modifica el comportamiento de  $\beta_\lambda^*$  y  $\omega_\lambda$ , mientras que  $g$  es independiente de las condiciones de cultivo y se mantiene en un valor de 0.9.

## Capítulo 8

### 8 PERSPECTIVAS

---

El crecimiento de microalgas depende de muchos factores como la temperatura, intensidad de luz, el medio de cultivo, salinidad, pH, entre otros. Sin embargo, debido a que existe poca información sobre las mejores condiciones de cultivo para la microalga *Coelastrrella striolata* es necesario optimizar estas condiciones de cultivo, que permitan alcanzar mayores concentraciones de biomasa. Asimismo, es necesario diseñar y construir fotobiorreactores (FBRs) que permitan su cultivo a mayor escala. Por otra parte, es indispensable encontrar técnicas analíticas más precisas para las determinaciones de concentraciones de nutrientes, para tener un mejor entendimiento de lo que está ocurriendo entre la interacción de las microalgas y el medio de cultivo.

Dado que se lograron determinar las características radiativas en diferentes etapas de crecimiento y en condiciones de estrés para la inducción de la carotenogénesis; es necesario validar estas propiedades en sistemas de cultivo a una escala mayor, por ejemplo, en fotobiorreactores de tipo columna de burbujeo o airlift, que son los más utilizados y con mayores rendimientos de biomasa. Además, con estas propiedades se puede obtener el campo radiativo dentro de estos sistemas y compararlo en diferentes etapas de cultivo. Otra propuesta para la continuación de este proyecto es acoplar estos resultados a modelos cinéticos de crecimiento en diferentes etapas de cultivo. Asimismo, se podrían estimar las características radiativas de cepas de microalgas más estudiadas y utilizadas a nivel industrial para la producción de pigmentos carotenoides como *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis*, y contrastarlas con las de *Coelastrrella striolata*.

Existen diversas áreas de oportunidad para mejorar el sistema experimental de características radiativas, una de ellas es la incorporación de un sistema de agitación más efectivo para asegurar que las células (partículas) se encuentren homogéneamente distribuidas. También se podría ajustar o proponer un modelo radiativo que considere los aglomerados y concentraciones altas de biomasa (es decir,  $\tau > 1$ ). Igualmente se podría cambiar la potencia de led por uno de mayor potencia que no cause la fotoinhibición de las microalgas.

Se propone darle un pretratamiento a la biomasa antes de realizar la extracción de pigmentos como puede ser la sonicación, liofilización o microondas; esto permitiría la disrupción de la pared celular y por lo tanto se podría recuperar mayor contenido de pigmentos. Una vez obtenidos los extractos es necesario evaluar si estos necesitan algún proceso de purificación y posteriormente identificarlos a través de técnicas más finas como cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) o espectrofotometría de masas, lo que ayudaría a identificar qué tipos de pigmentos predominan en las células de la microalga *Coelastrrella striolata*, tanto a través de su crecimiento como en la carotenogénesis.

Además de la caracterización de los pigmentos carotenoides extraídos, también se propone la caracterización de la biomasa resultante del proceso de extracción, ya que esto permitiría tal vez una valorización mediante su aprovechamiento como biofertilizante o producción de biocombustibles. Esto aportaría a proponer un esquema de biorrefinación como enfoque de proceso de economía circular.

## 9 REFERENCIAS

- [1] Mulders K.J., Lamers P.P., Martens D.E. y Wijffels R.H. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology*, 50(2), 229–242, 2014.
- [2] Ambati R.R., Gogisetty D., Aswathanarayana R.G., Ravi S., Bikkina P.N., Bo L. y Yuepeng S. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1880-1902, 2019.
- [3] Saini R.K., Prasad P., Lokesh V., Shang X., Shin J., Keum Y.S. y Lee J.H. Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits-A Review of Recent Advancements. *Antioxidants*, 11(4), 795, 2022.
- [4] Corato A., Le T.T., Baurain D., Jacques P., Remacle C. y Franck F. A Fast-Growing Oleaginous Strain of *Coelastrrella* Capable of Astaxanthin and Canthaxanthin Accumulation in Phototrophy and Heterotrophy. *Life*, 12(3), 334, 2022.
- [5] Sun X.M., Ren L.J., Zhao Q.Y., Ji X.J. y Huang H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11(272), 1-16, 2018.
- [6] Ibañez M.V., Leonardi R.J., Heinrich J.M., Steingroewer J., Walther T. y Felix K. A rapid assessment of the radiative properties from a suspension of *Chromochloris zofingiensis*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 3–4, 100007, 2020.
- [7] Berberoglu H., Pilon L. y Melis A. Radiation characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and its truncated chlorophyll antenna transformants tla1, tlaX and tla1-CW+. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6467–6483, 2008.
- [8] Pilon L., Berberoglu H. y Kandilian R. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112(17), 2639–2660, 2011.

- [9] Berberoglu H. y Pilon L. Experimental measurements of the radiation characteristics of *Anabaena variabilis* ATCC 29413-U and *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 49419. *International Journal Hydrogen Energy*, 32(18), 4772–4785, 2007.
- [10] Berberoglu H., Gomez P. S. y Pilon L. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. *Journal Quantitative Spectroscopy Radiative Transfer*, 110(17), 1879–1893, 2009.
- [11] Heng R.L. y Pilon L. Time-dependent radiation characteristics of *Nannochloropsis oculata* during batch culture. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 144, 154–163, 2014.
- [12] Zhao J.M., Ma C.Y. y Liu L.H. Temporal scaling of the growth dependent optical properties of microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 217, 61–70, 2018.
- [13] Ma C.Y., Zhao J.M. y Liu L.H. Experimental study of the temporal scaling characteristics of growth-dependent radiative properties of *Spirulina platensis*. *Journal Quantitative Spectroscopy Radiative Transfer*, 217, 453–458, 2018.
- [14] Novoveská L., Ross M.E., Stanley M.S., Pradelles R., Wasiolek V. y Sassi J.F. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs*, 17(11), 640, 2019.
- [15] Nagarajan J., Ramanan R.N., Raghunandan M.E., Galanakis C.M. y Krishnamurthy N.P., “Carotenoids” in *Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques*, Elsevier Inc., 259–296, 2017.
- [16] Vílchez C., Forján E., Cuaresma M., Bédmar F., Garbayo I. y Vega J. M. Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, 9(3), 319–333, 2011.
- [17] Yaqoob S., Riaz M., Shabbir A., Zia-Ul-Haq M., Alwakeel S.S. y Bin-Jumah M. Commercialization and Marketing Potential of Carotenoids, in *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*, Springer International Publishing, 799–826, 2021.

- [18] Gong M. y Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412, 2016.
- [19] Guedes A.C., Amaro H.M. y Malcata F.X. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4), 625–644, 2011.
- [20] von Alvensleben N. y Heimann K. The Potential of Microalgae for Biotechnology: A Focus on Carotenoids, in *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, London: Wiley & Son, 117-142, 2018.
- [21] Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101–1118, 2011.
- [22] Lee E., Jalalizadeh M. y Zhang Q. Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12, 497–512, 2015.
- [23] Aziz M.M.A., Kassim K.A., Shokravi Z., Jakarni F.M., Lieu H.Y., Zaini N., Tan L.S., Saiful A.B.M. y Shokravi H. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 2020.
- [24] Ren Y., Sun H., Deng J., Huang J. y Chen F. Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. *Marine Drugs*, 19(12), 2021.
- [25] Liyanaarachchi V.C., Premaratne M., Ariyadasa T.U., Nimarshana P. H.V., y Malik A. Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. *Algal Research*, 57, 102353, 2021.
- [26] Ali H. E. A., El-fayoumy E. A., Rasmy W. E., Soliman R. M., y Abdullah M. A. Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 227–239, 2021.
- [27] Abe K., Hattori H. y Hirano M. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry*, 100(2), 656–661, 2007.
- [28] Hu C.W., Chuang L.T., Yu P.C. y Chen C.N.N. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food Chemistry*, 138(4), 2071–2078, 2013.

- [29] Aburai N., Ohkubo S., Miyashita H. y Abe K. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research*, 2(3), 237–243, 2013.
- [30] Béchet Q., Shilton A. y Guieysse B. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1648–1663, 2013.
- [31] Modest M.F. The Radiative Transfer Equation in Participating Media (RTE) in *Radiative Heat Transfer*, USA: Academic Press, 279–302, 2013.
- [32] Fei T., Lin L., Li X., Yang J.Y., Zhao J. y Liu L. Modeling Effect of Bubbles on Time-Dependent Radiation Transfer of Microalgae in a Photobioreactor for Carbon Dioxide Fixation. *Photonics*, 9(11), 864, 2022.
- [33] Sacadura J.F. Thermal radiative properties of complex media: Theoretical prediction versus experimental identification. *Heat Transfer Engineering*, 32(9), 754–770, 2011.
- [34] Hannis K. Optical behavior of algae particles in photobioreactors. Tesis de maestría, Universidad Tecnológica de Delft, Países Bajos, 5-10, 2013.
- [35] Castillo L.A, Valadés P. J., Ávila H.J., Cabello J.J. y Balbuena A. Methodology for the fast direct estimation of spectral radiative transport properties in microalgae photobioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 458, 141462, 2023.
- [36] Heinrich J.M., Niizawa I., Botta F.A., Trombert A.R. y Irazoqui H.A. Analysis and Design of Photobioreactors for Microalgae Production I: Method and Parameters for Radiation Field Simulation. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 938–951, 2012.
- [37] Ali H.E.A., Vorisek F., Dowd S.E., Kesner S., Song Y., Qian D. y Crocker M. Formation of Lutein,  $\beta$ -Carotene and Astaxanthin in a *Coelastrrella* sp. Isolate. *Molecules*, 27(20), 6950, 2022.
- [38] Ruiz D.M. y Longoria A.M. Cultivo microalgal y análisis de la producción de metabolitos de alto valor agregado bajo el concepto de biorrefinería. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Energías Renovables, Temixco, Morelos, 39-53, 2020.

- [39] Rodríguez M.C., Lozano C., y Álvarez S. H. Potential use of some species of microalgae and cyanobacteria as erythrocyte agglutinators and bactericides. *Hidrobiológica*, 32(1), 17–24, 2022.
- [40] Rodríguez M.C., Cabrera R.B.E., Rolón J.C., Tobías R., Martínez M. y Lozano C. The cultivation of five microalgae species and their potential for biodiesel production. *Energy, Sustainability and Society*, 12(10), 2022.
- [41] Fernández L.C., Guerrero C., Durán E. y Badillo J.A. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. *Bioresource Technology*, 244, 400–406, 2017.
- [42] Halim R., Hosikian A., Lim S. y Danquah M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, 1-11, 2010.
- [43] Liu C., Hu B., Cheng Y., Guo Y., Yao W., y Qian H., “Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology*, 337, 1-13, 2021.
- [44] Lichtenthaler H.K. y Buschmann C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8, 2001.
- [45] Fal S., Aasfar A., Rabie R., Smouni A. y el Arroussi H. Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Heliyon*, 8(1), 2022.
- [46] Radice R.P., Fiorentino R., De Luca M., Limongi A.R., Viviano E., Bermano G. y Martelli G. An innovative protocol to select the best growth phase for astaxanthin biosynthesis in *H. pluvialis*. *Biotechnology reports*, 31, 2021.
- [47] Micha P. y Corradini M.G. Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917–945, 2011.
- [48] Rao R. y Basak N. Optimization and modelling of dark fermentative hydrogen production from cheese whey by *Enterobacter aerogenes* 2822. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(2), 1777–1800, 2021.
- [49] Ajala S.O. y Alexander M.L. Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in

- wastewater. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 11(3), 311–326, 2020.
- [50] Stemkovski M., Baraldi R., Flores K.B. y Banks H.T. Validation of a mathematical model for green algae (*Raphidocelis subcapitata*) growth and implications for a coupled dynamical system with *Daphnia magna*. *Applied Sciences*, 6(5), 2016.
- [51] Ansari F.A., Ravindran B., Gupta S.K., Nasr M., Rawat I. y Bux F. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*, 240, 293–302, 2019.
- [52] Yaakob M.A., R. Mohamed M.S.R., Al-Gheethi A., Ravishankar G.A., y Ambati R.R. Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells*, 10(2), 1–19, 2021.
- [53] Hellebust J.A. y Ahmad I. Biological Oceanography Regulation of Nitrogen Assimilation in Green Microalgae. *Biological Oceanography*, 6(3-4), 241-255, 1988.
- [54] da Silva Ferreira V. y Sant’Anna, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 2017.
- [55] Jacob-Lopes E., Queiroz M. I. y Queiroz L. Pigments from Microalgae Handbook. Switzerland: Springer Nature, 69-80, 2020.
- [56] Maneechote W., Cheirsilp B., Srinuanpan S. y Pathom-aree W. Optimizing physicochemical factors for two-stage cultivation of newly isolated oleaginous microalgae from local lake as promising sources of pigments, PUFAs and biodiesel feedstocks. *Bioresource Technology Reports*, 15, 2021.
- [57] Borowitzka M.A. The ‘stress’ concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2815–2825, 2018.
- [58] Saeki K., Aburai N., Aratani S., Miyashita H. y Abe K. Salt-stress and plant hormone-like responses for selective reactions of esterified xanthophylls in the aerial microalga *Coelastrella* sp. KGU-Y002. *Journal Applied Phycology*, 29(1), 115–122, 2017.

- [59] Mao X., Zhang Y., Wang X. y Liu J. Novel insights into salinity-induced lipogenesis and carotenogenesis in the oleaginous astaxanthin-producing alga *Chromochloris zofingiensis*: A multi-omics study. *Biotechnology Biofuels*, 13(1), 2020.
- [60] Varela J.C., Pereira H., Vila M. y León R. Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436, 2015.
- [61] Elloumi W., Jebali A., Maalej A., Chamkha M. y Sayadi S. Effect of mild salinity stress on the growth, fatty acid and carotenoid compositions, and biological activities of the thermal freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Biomolecules*, 10(11), 1–17, 2020.
- [62] Urek R. y Kerimoglu Y. Evaluation of Effects of  $Mg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on Pigment-Metabolite Production and Photosystem II Activity of *Arthrospira platensis* Gomont 1892. *Turkish Journal Fisheries Aquatic Sciences*, 19(10), 2019.
- [63] Mallick N. y Mohn F.H. Reactive oxygen species: Response of algal cells. *Journal Plant Physiology*, 157(2), 183–193, 2000.
- [64] Cirulis J. T., Scott J. A., y Ross G. M. Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(1), 15-21, 2013.
- [65] Quijano-Ortega N, Fuenmayor CA, Zuluaga-Dominguez C, Diaz-Moreno C, Ortiz-Grisales S, García-Mahecha M y Grassi S. FTIR-ATR Spectroscopy Combined with Multivariate Regression Modeling as a Preliminary Approach for Carotenoids Determination in *Cucurbita* spp. *Applied Sciences*, 10(11), 3722, 2020.
- [66] Chang H., Kao M.J., Chen T.L., Chen C.H., Cho K.C. y Lai X.R. Characterization of natural dye extracted from wormwood and purple cabbage for dye-sensitized solar cells. *International Journal of Photoenergy*, 2013, 2013.
- [67] Shamaei A., Mahmoudi B., Kazemnejadi M., y Nasser M.A. Mg-catalyzed one-pot preparation of benzimidazoles and spirooxindoles by an immobilized chlorophyll b on magnetic nanoparticles. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(12), 2020.

- [68] Liu J. y Huang Q. Screening of Astaxanthin-Hyperproducing *Haematococcus pluvialis* Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Raman Microspectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 70(10), 1639–1648, 2016.
- [69] Lehmuskero A., Skogen Chauton M. y Boström T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 168, 43–56, 2018.
- [70] Uzun İ., Orak İ., Sevgili Ö., Yiğit E., y Karakaplan M. Synthesis of canthaxanthin from  $\beta$ -carotene and evaluation of both substances in diode construction. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 33(4), 1888–1898, 2022.

## 10 ANEXOS

### 10.1 Anexo I. Espectro de absorción de la microalga *Coelastrrella striolata* en suspensión

En la Figura 47 se muestra en el espectro de absorción para la microalga *Coelastrrella striolata*, presentando un máximo de absorción a una longitud de onda de 682 nm, correspondiente a la presencia de clorofila a [69]. Es por ello que para determinar la absorbancia de las muestras se utilizó esta longitud de onda.

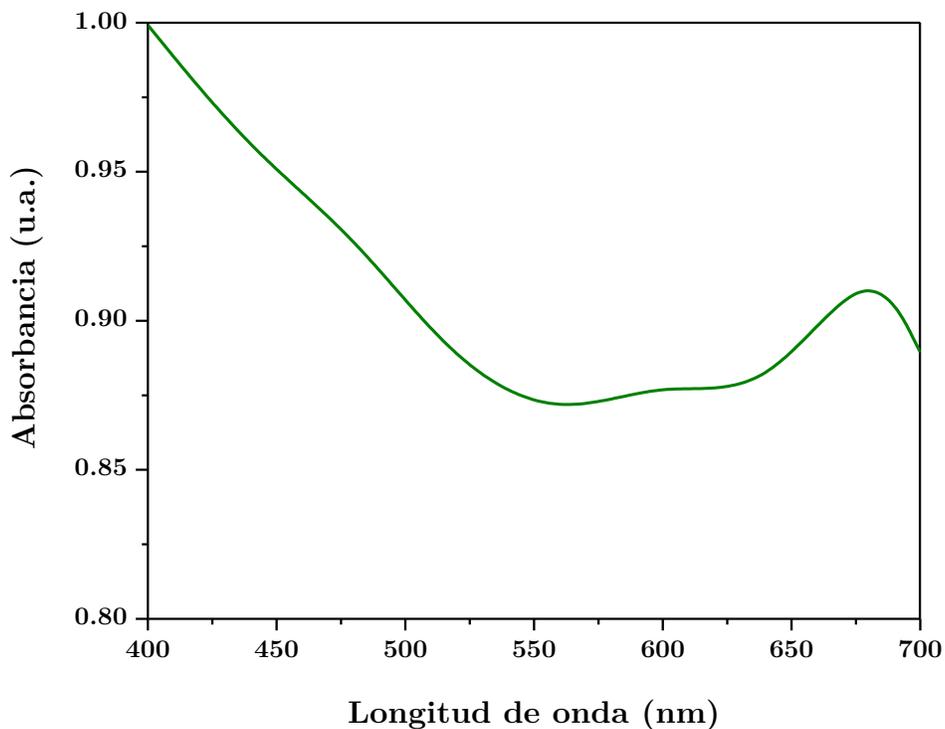


Figura 47. Espectro de absorción en la región PAR (400-700 nm) para la microalga *Coelastrrella striolata* en suspensión.

## 10.2 Anexo II. Curva patrón de concentración de biomasa de la microalga *Coelastrella striolata* en medio Bayfolan® Forte

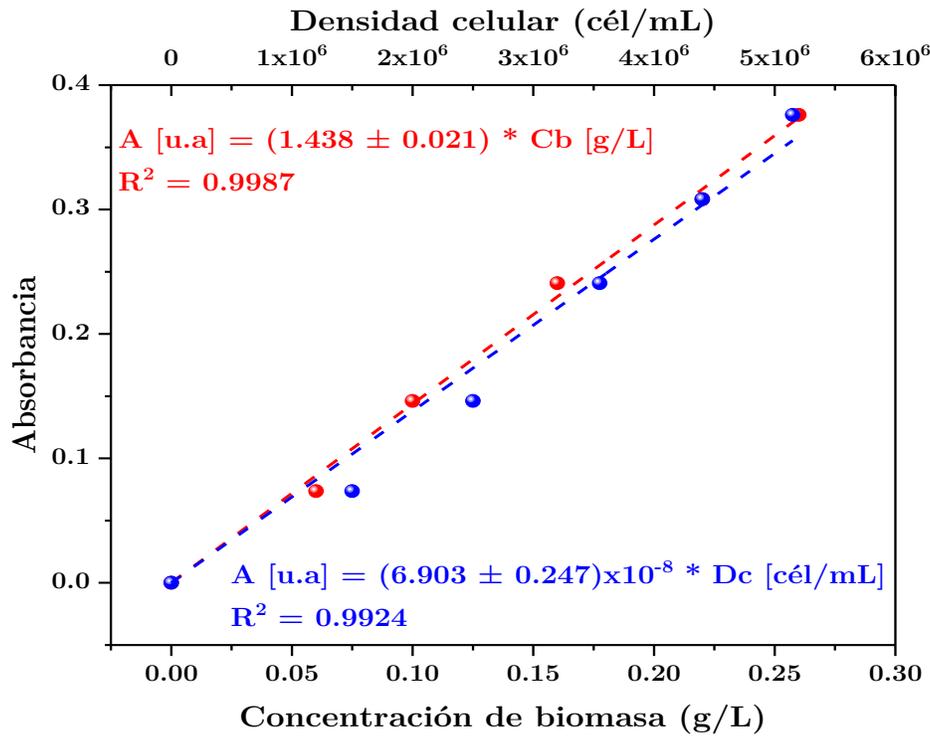


Figura 48. Curva patrón de concentración de biomasa y densidad celular de la microalga *Coelastrella striolata* en medio Bayfolan® Forte

### 10.3 Anexo III. Método de Monte Carlo Ray Tracing (MCRT)

La RTE se resuelve mediante el método Monte Carlo Ray Tracing (MCRT), teniendo en cuenta la emisión de fotones, la interacción con las superficies esféricas, la interacción con las microalgas suspendidas en el cultivo, la dispersión, la absorción y los fotones transmitidos del sistema. Este enfoque se implementa en un dominio esférico presentado en la Figura 10. Este método está basado en caminatas aleatorias (un número estadísticamente significativo de ellas) que representan las trayectorias de “haces de fotones”. Los fotones son rastreados hasta que son absorbidos. La ubicación final, junto con la longitud de onda del fotón absorbido, se almacena en una matriz. La trayectoria de cada fotón se define en base a un proceso estocástico, en el que los eventos, resultados y probabilidades de cada posible fotón se eligen para representar fenómenos naturales dentro del sistema [35]. El algoritmo se presenta en la Figura 49.

Para la implementación de este método se consideraron las siguientes suposiciones:

- Campo de intensidad de luz axisimétrico.
- Mezclado y distribución de partículas homogéneo.
- La partícula (microalga) se trata como una partícula grande y esférica, por lo que se puede considerar aplicar óptica geométrica.
- La dispersión es gobernada por un solo evento de dispersión.
- Las condiciones de frontera consideran la reflexión especular según las ecuaciones de Fresnel, considerando el índice de refracción del agua, el vidrio Pyrex y el aire.
- La emisión de luz se considera como un rayo que va en una sola dirección.
- La radiación de la fuente se trata como una fuente puntual de haz colimado en la superficie de la esfera.

La emisión de un fotón en MCRT se muestrea como un proceso estocástico definido por las especificaciones de la lámpara. En primer lugar, las posibles distancias de viaje de los fotones dentro del sistema se calculan mediante el muestreo de la ecuación de la ley de Beer-Lambert. Posteriormente, se selecciona la distancia positiva más corta para determinar si el fotón interactúa con las microalgas suspendidas o con la pared esférica del contenedor. En el caso de un evento de interacción con microalgas, se muestrea un número aleatorio en el rango de 0–1 y se compara con el albedo de dispersión único ( $\omega_\lambda$ ). Cuando está más bajo, la trayectoria del haz de fotones termina y el proceso comienza de nuevo con el haz de fotones; de lo contrario, el haz de fotones se dispersa y la función fase se muestrea para determinar un ángulo de dispersión ( $\mu_s$ ) y una nueva

dirección de propagación para el haz de fotones. En el caso de que un fotón interactúe con las paredes esféricas del contenedor, su trayectoria termina.

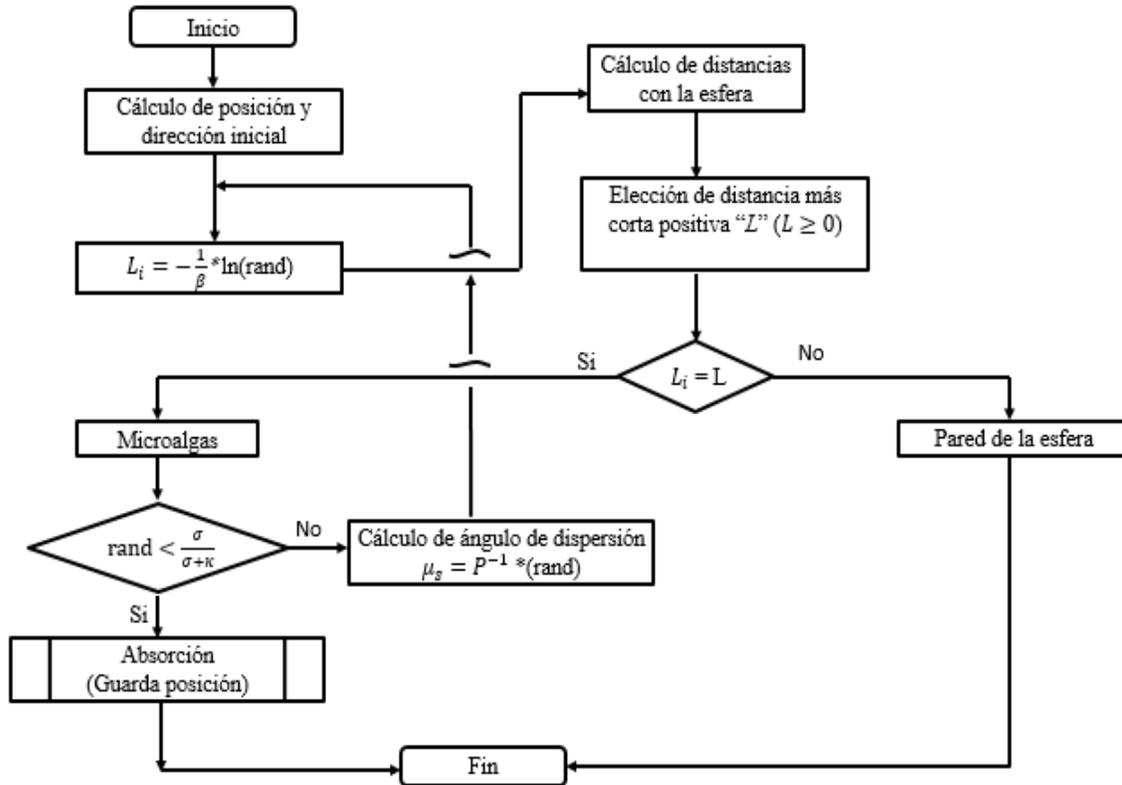


Figura 49. Diagrama de bloques del método MCRT para resolver la ecuación de transferencia radiativa dentro del montaje experimental (recipiente esférico). Adaptado de [35].

#### 10.4 Anexo IV. Caracterización de la fuente de luz LED

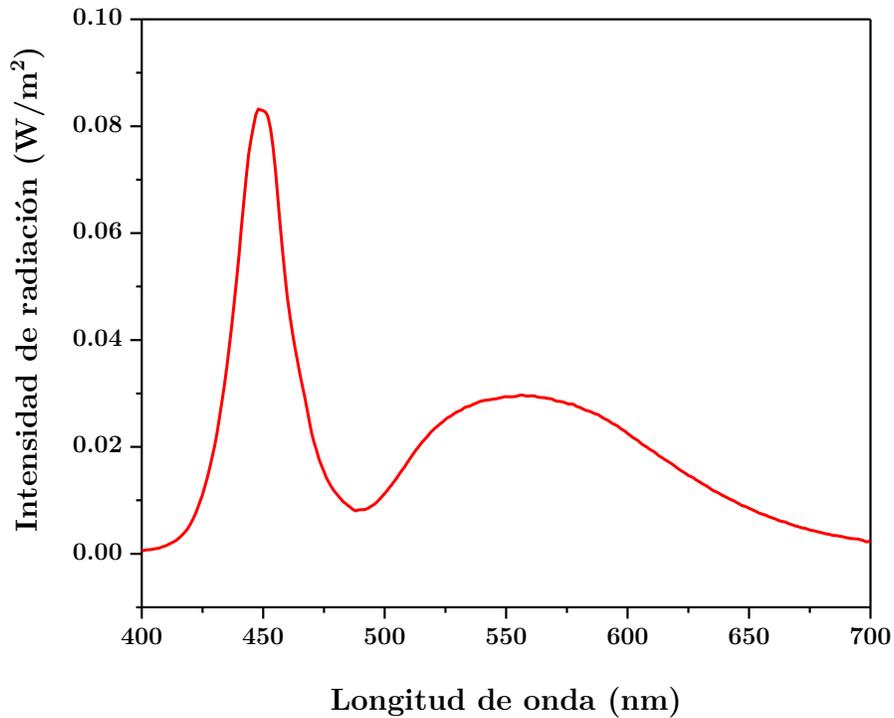


Figura 50. Espectro de emisión de la fuente de luz LED utilizada en la determinación de características radiativas.

### 10.5 Anexo V. Coeficiente de absorción específico in vivo en $[m^2/g]$ de pigmentos

La absorción de cada pigmento depende en gran medida de la longitud de onda de la luz (Figura 51). Esto, junto con la dispersión selectiva de la longitud de onda, da un color a las algas cuando se ven a simple vista. La sección transversal de absorción de clorofila a in vivo alcanza su punto máximo en las longitudes de onda azul (440 nm) y roja (675 nm).

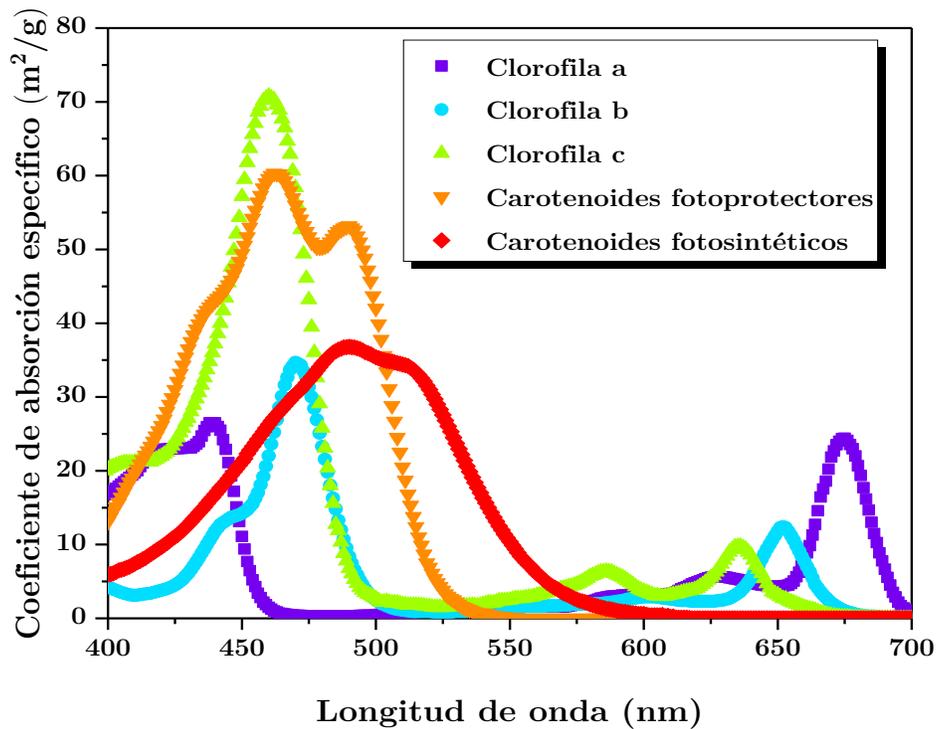


Figura 51. Coeficiente de absorción específico in vivo en  $[m^2/g]$  de pigmentos [69].

## 10.6 Anexo VI. Histogramas de distribución de tamaño de células

Los histogramas de la distribución del tamaño de células que se muestran a continuación se obtuvieron de más de 10 imágenes obtenidas con un microscópico óptico bajo un objetivo de 40x y mediante la ayuda de una cámara se contaron alrededor de 100 células por muestra con ayuda del software ToupView®.

### 10.6.1 Cultivo control

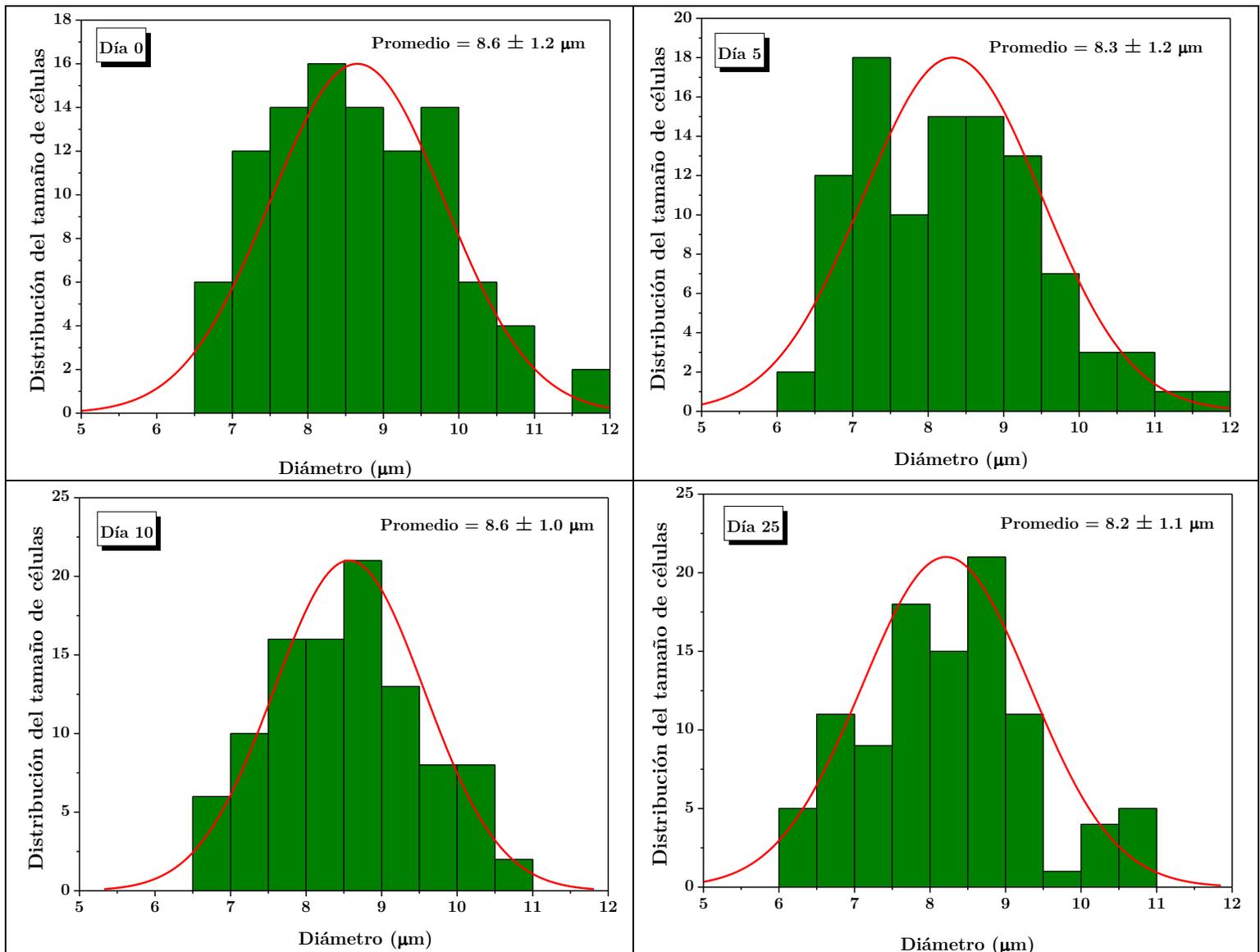


Figura 52. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* sin cloruros (Control).

10.6.2 Cultivos con NaCl

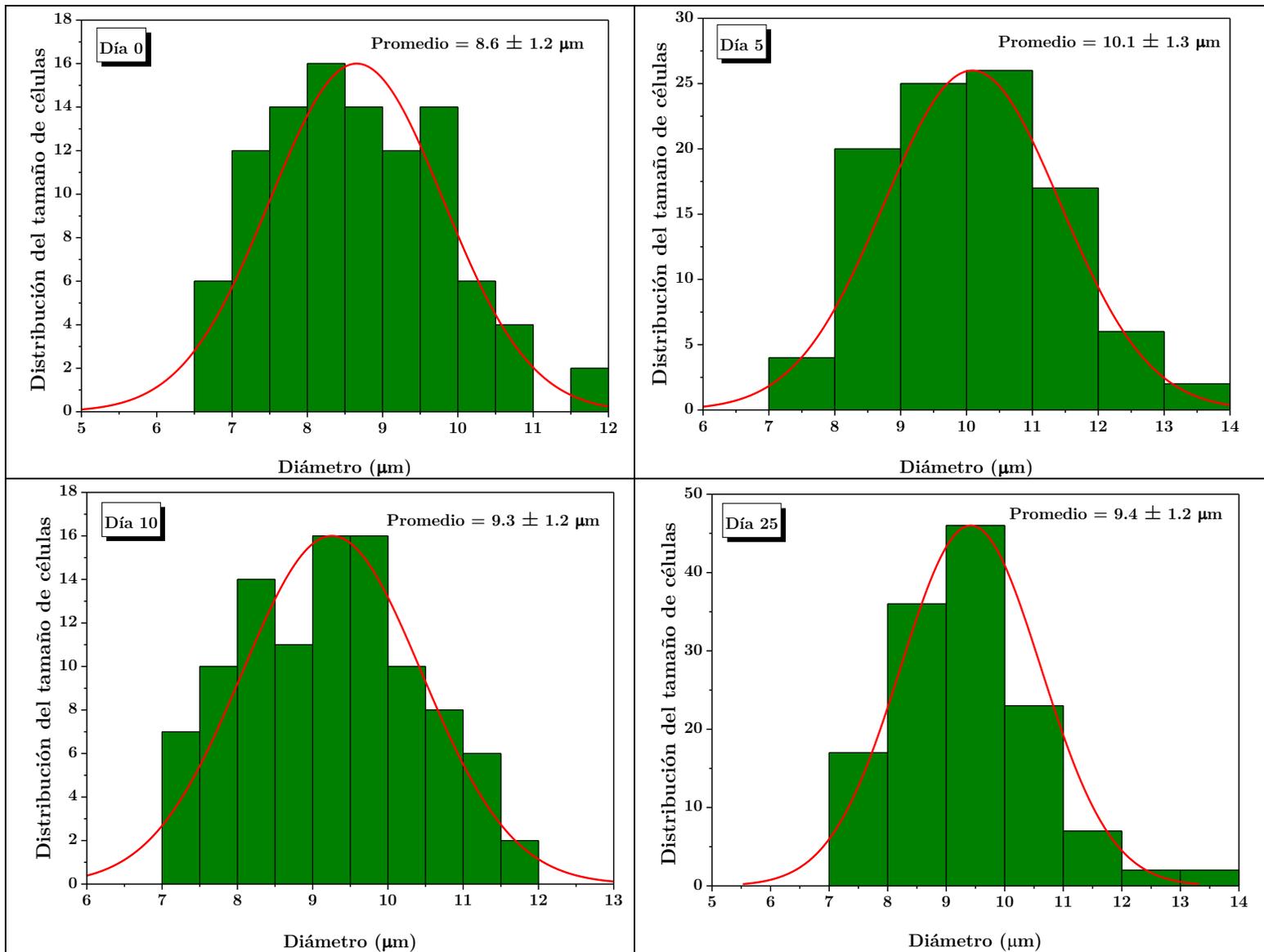


Figura 53. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* con 0.086 [Cl<sup>-</sup>] M.

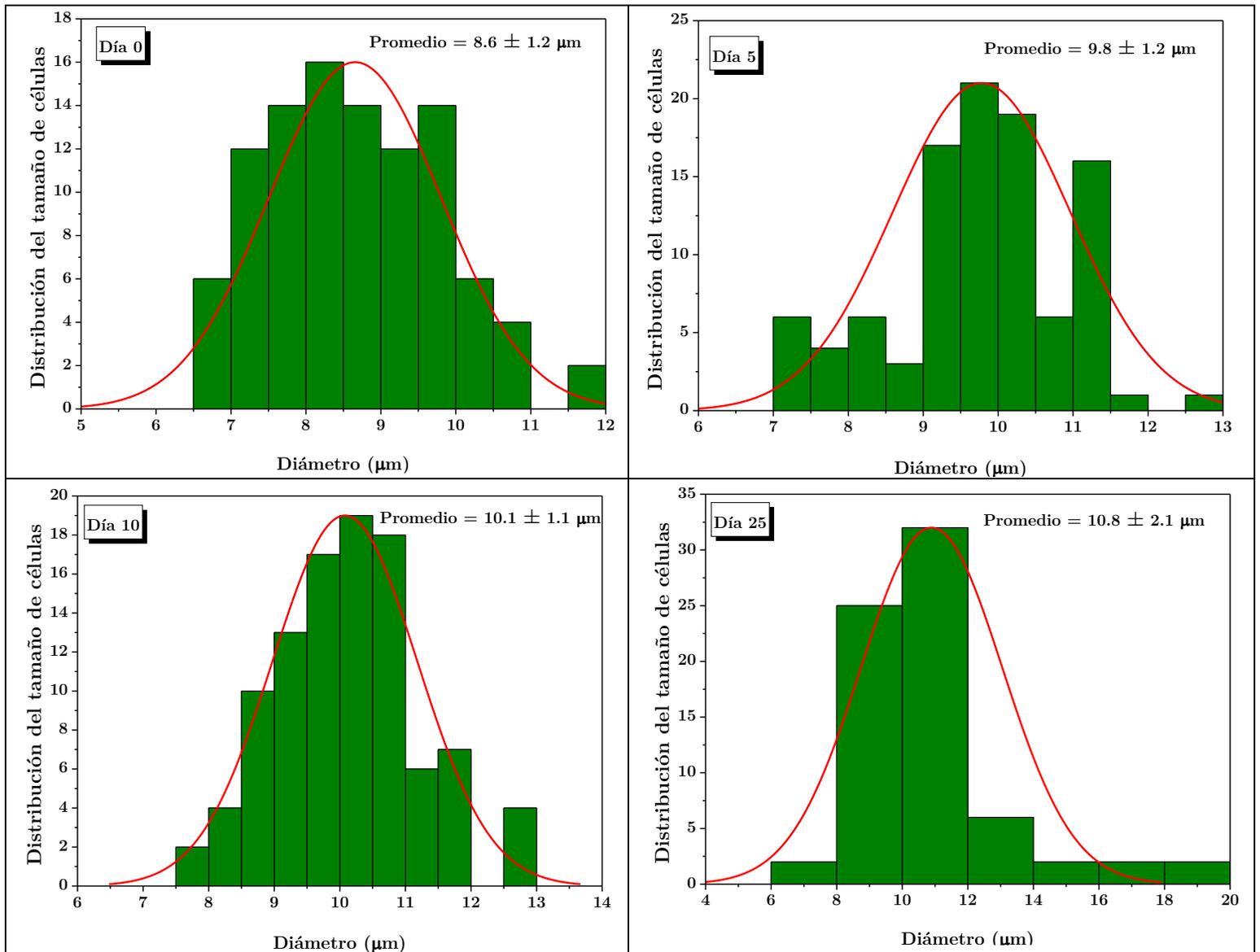


Figura 54. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* con 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M.

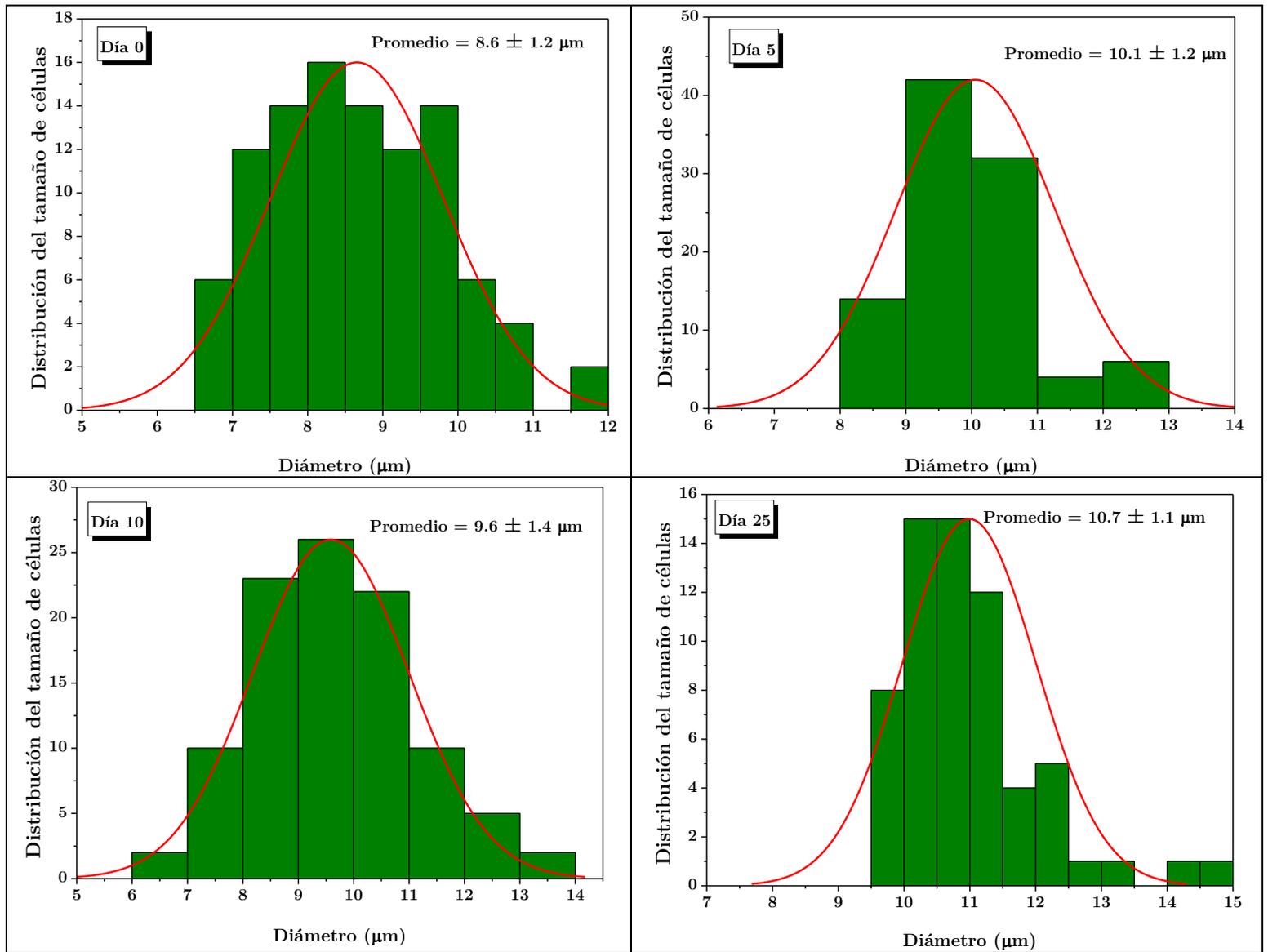


Figura 55. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* con 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M.

10.6.3 Cultivos con MgCl<sub>2</sub>

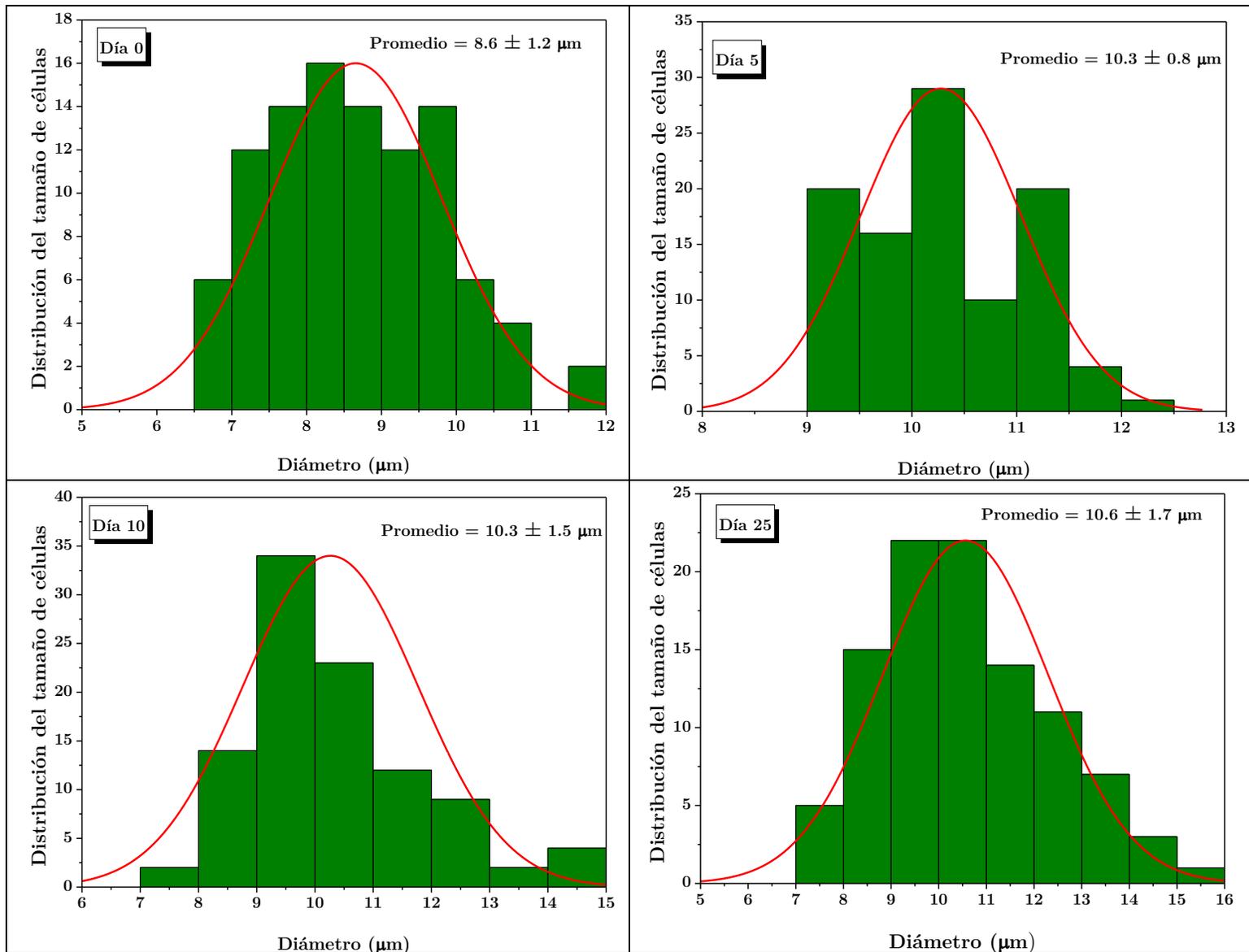


Figura 56. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* con 0.086 [Cl<sup>-</sup>] M.

*Características radiativas de la microalga Coelastrella striolata, productora de carotenoides durante diferentes etapas de cultivo*

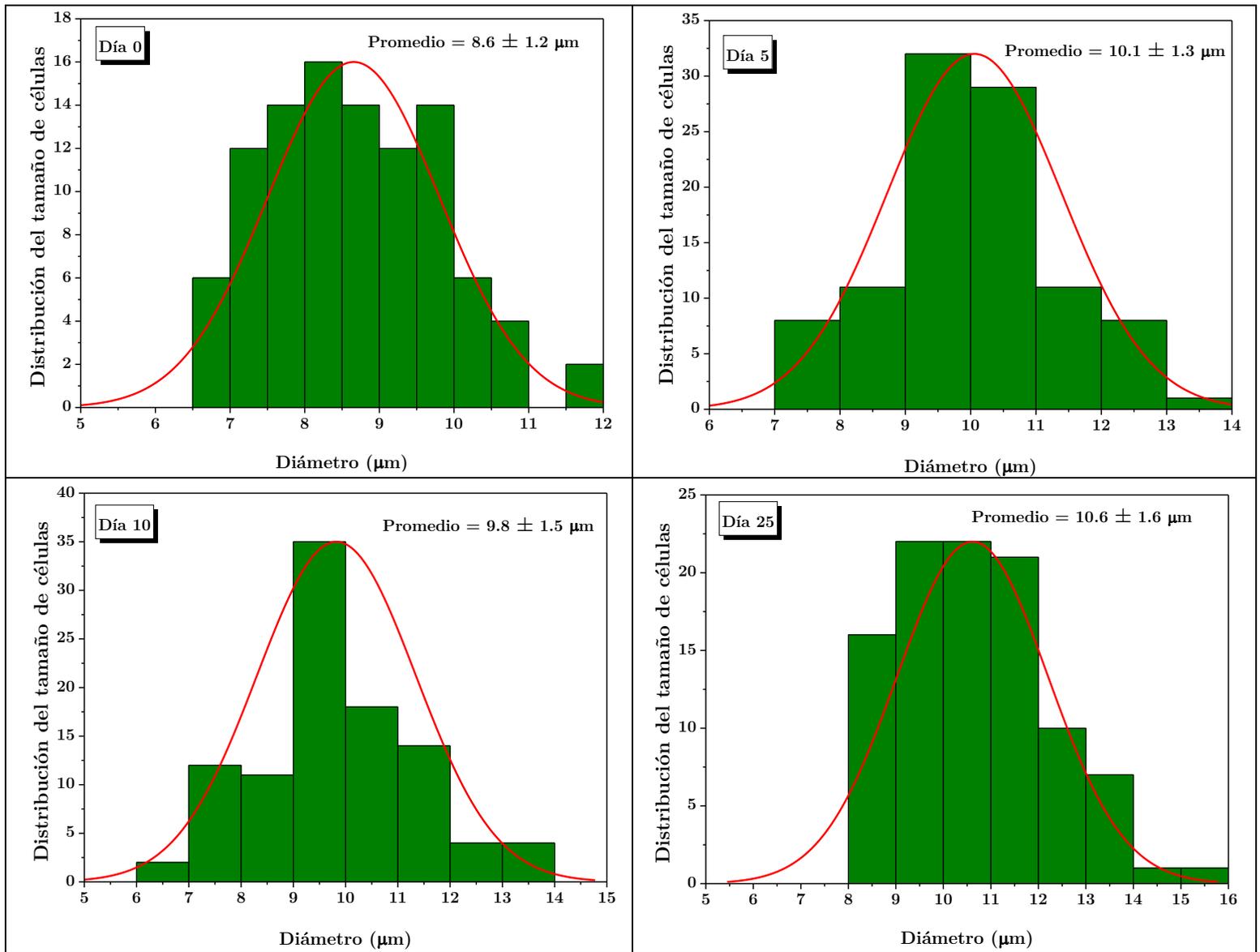


Figura 57. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* con 0.173 [Cl<sup>-</sup>] M.

*Características radiativas de la microalga Coelastrella striolata, productora de carotenoides durante diferentes etapas de cultivo*

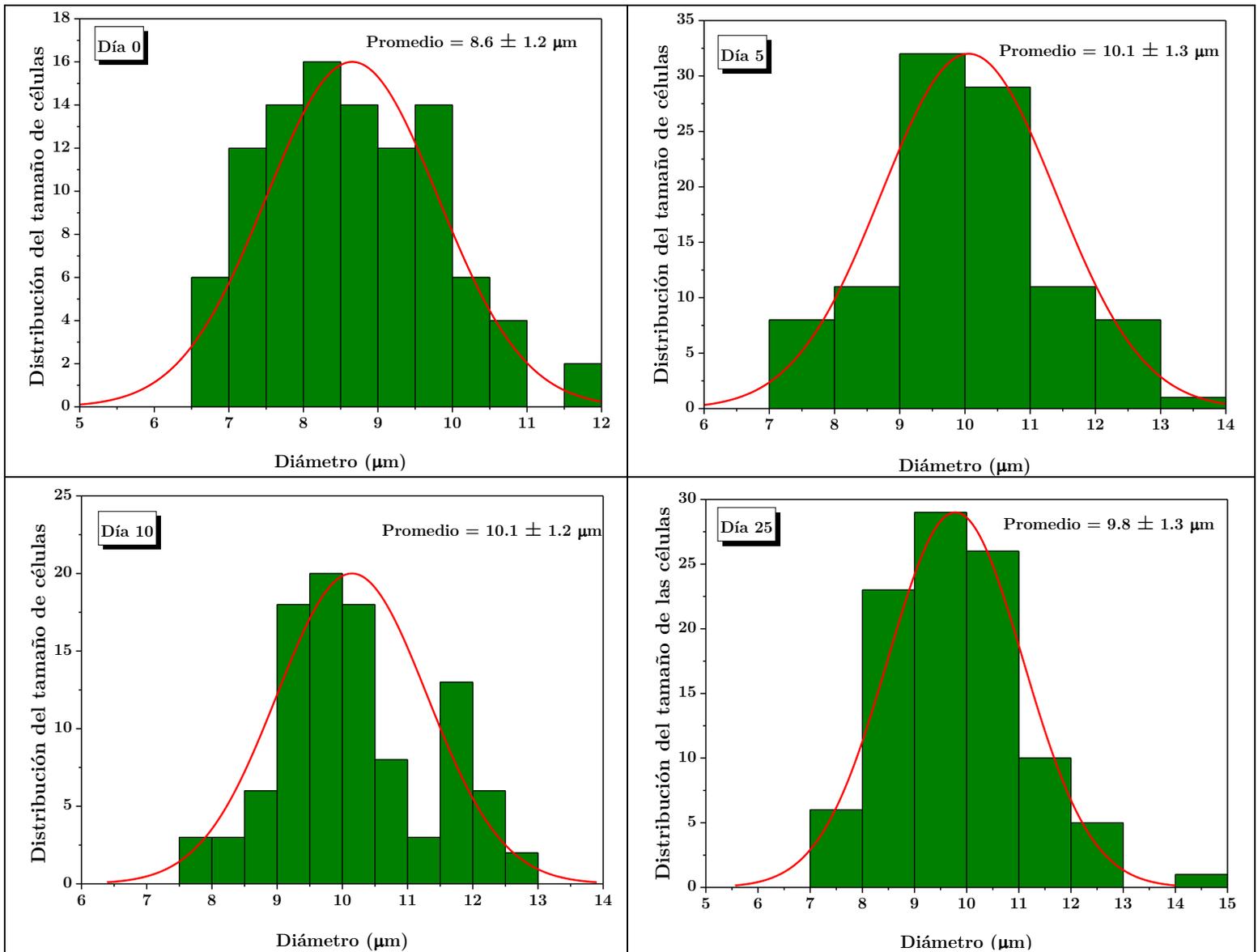


Figura 58. Histogramas de distribución de células del cultivo de *Coelastrella striolata* con 0.260 [Cl<sup>-</sup>] M.

### 10.7 Anexo VII. Espectros infrarrojos (IR) obtenidos de la literatura para distintos pigmentos

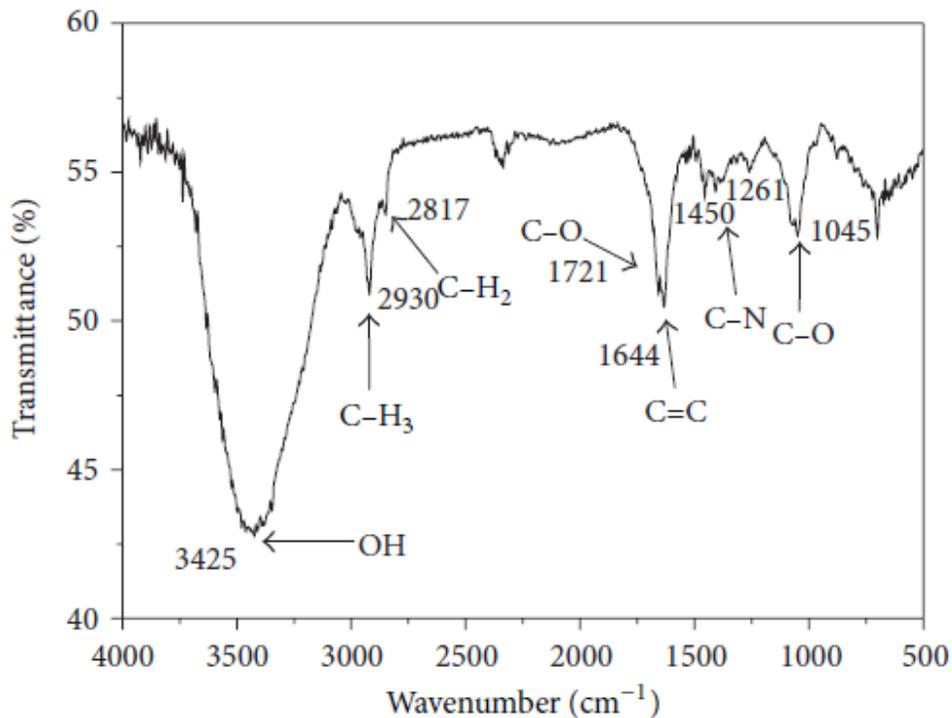


Figura 59. Espectro IR de clorofila a. Tomado de [66].

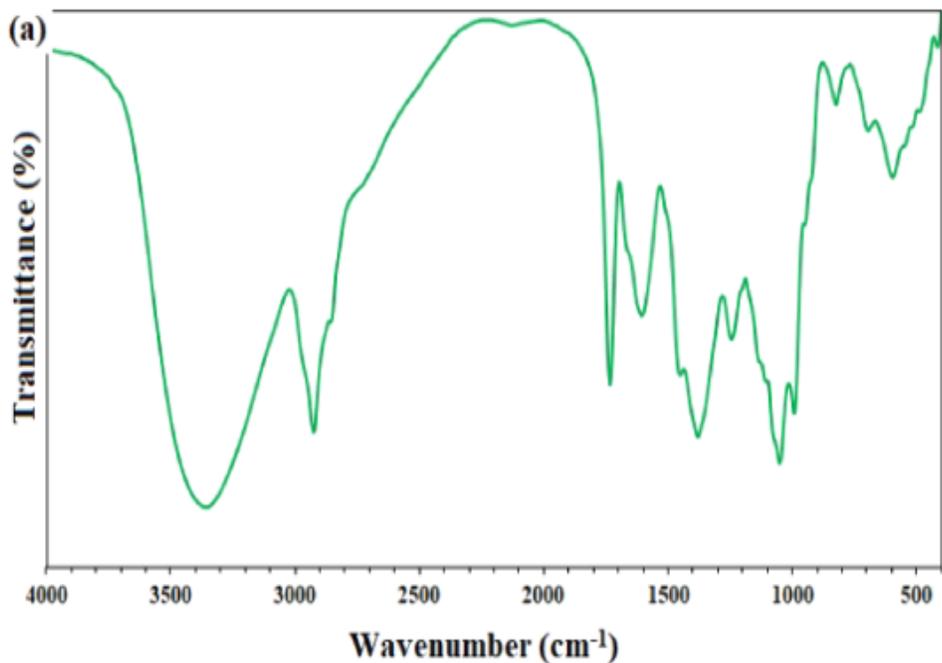


Figura 60. Espectro IR de clorofila b. Tomado de [67].

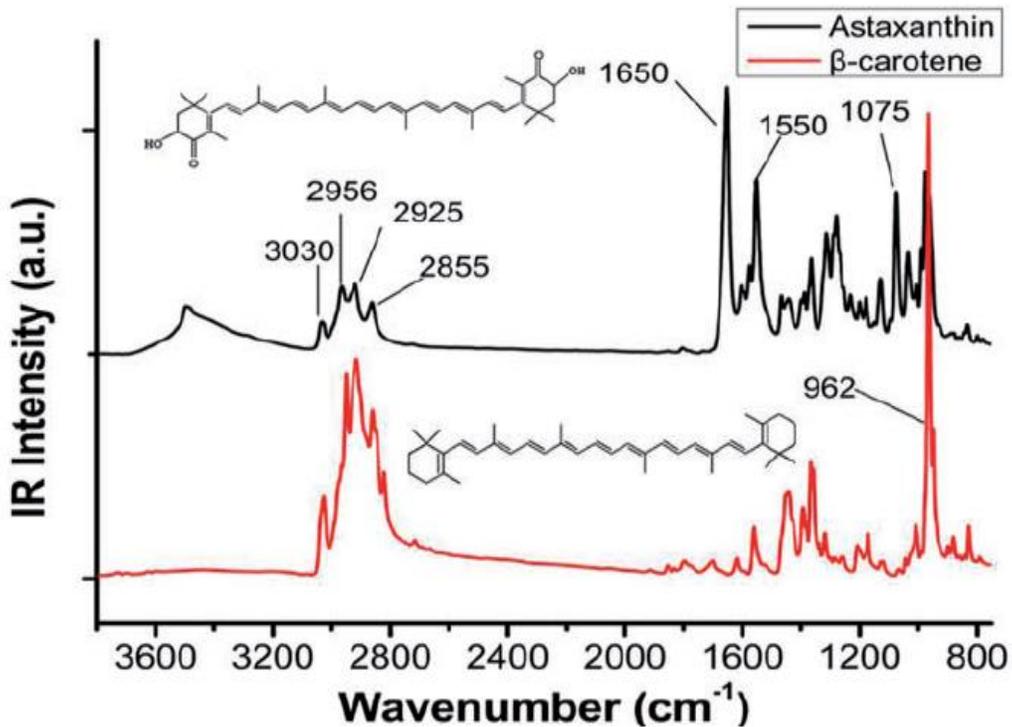


Figura 61. Espectro IR de astaxantina y  $\beta$ -caroteno. Tomado de [68].

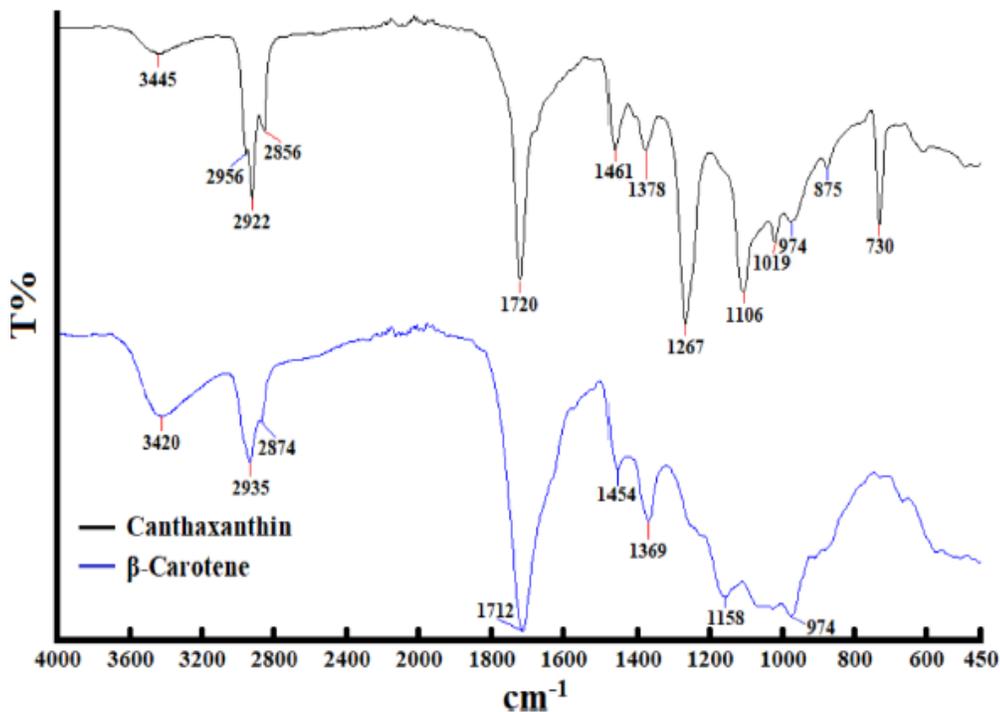


Figura 62. Espectro IR de cantaxantina y  $\beta$ -caroteno. Tomada de [70].



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00154

Matrícula: 2202800139

Características radiativas de la microalga *Coelastrella striolata*, productora de carotenoides durante diferentes etapas de cultivo.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 5 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA  
DRA. HEIDI ISABEL VILLAFAN VIDALES  
DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA QUIMICA)

DE: EDUARDO MARTINEZ NIÑO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



EDUARDO MARTINEZ NIÑO  
ALUMNO

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA

VOCAL

DRA. HEIDI ISABEL VILLAFAN VIDALES

SECRETARIO

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO  
CASTAÑEDA