

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la producción de lípidos utilizando *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente

Trabajo de graduación presentado por Ana Cristina Montúfar Mayorga para
optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología
Industrial

Guatemala

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



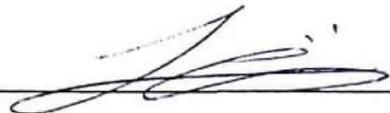
Evaluación de la producción de lípidos utilizando *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente

Trabajo de graduación presentado por Ana Cristina Montúfar Mayorga para
optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología
Industrial

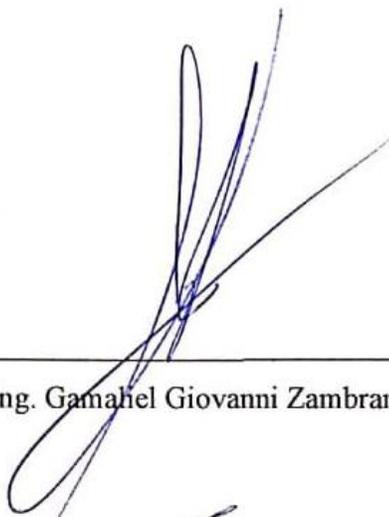
Guatemala

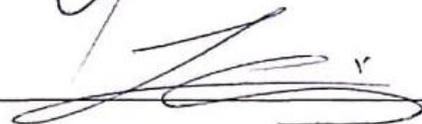
2023

Vo. Bo.:

(f) 
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Tribunal Examinador:

(f) 
Ing. Gamahel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc

(f) 
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M.BA & M. Sc.

(f) 
Ing. Carmen Ortiz, M.A.

Fecha de aprobación: 5 de enero del 2023

PREFACIO

El tema del presente trabajo de graduación nace de mi interés por los microorganismos, en especial de las microalgas, puesto que a lo largo de la carrera, en cursos como Microbiología, Retos ambientales y Bioingeniería, aprendí acerca del potencial que tienen las microalgas para producir compuestos de interés para la humanidad de forma sostenible. Específicamente, me interesó la capacidad que tienen las microalgas de producir aceites y cómo se pueden aprovechar para crear biocombustibles como alternativas a los combustibles fósiles. Además, dichos cursos me retaron y me motivaron a estudiar la cinética de crecimiento de las microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio, puesto que se espera que las bases de este estudio permitan desarrollar más investigaciones relacionadas al escalamiento de la producción de microalgas y sus productos.

Agradezco a Dios por la sabiduría y por bendecirme con la oportunidad de estudiar en la Universidad del Valle de Guatemala y poder culminar mi carrera con este trabajo de graduación. Agradezco a mi asesor Ing. Luis Ernesto Núñez González, MBA & M. Sc, por su confianza, apoyo, motivación y enseñanzas y a mi director de carrera Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc., por su confianza, apoyo y orientación, a lo largo de este trabajo. Asimismo, agradezco a mi profesor Lic. Carlo Martínez por su apoyo y consejos durante la experimentación; a las practicantes del CPI: Idida García, Jimena Martínez y Daniela Ávila por su ayuda en la elaboración de la experimentación; a Verónica Jiménez y Melisa Paredes, secretarias del departamento de Ingeniería Química, por su apoyo con la entrega de materiales para la experimentación y a los técnicos del Laboratorio de Operaciones Unitarias: Cristhian, Héctor y José por su apoyo con el mantenimiento de los fotobiorreactores y la entrega de materiales necesarios para la experimentación.

Agradezco a mis padres, Lucrecia y Gabriel, por todo su amor, sacrificio, apoyo, motivación y confianza que me brindaron en toda mi carrera y en especial en la elaboración del presente trabajo. Agradezco a mi hermano y abuelitos por su amor y apoyo. Agradezco a mi novio Héctor Morales por su amor, apoyo y consejos durante toda mi carrera y en la elaboración de este trabajo. Agradezco a mis tías Sari, Jeannette y Cecilia por confiar en mí y por brindarme su apoyo emocional y económico para la elaboración de la experimentación. Agradezco a todos mis tíos y demás familiares cercanos por todo su amor y apoyo. Por último, agradezco a mis amigos por motivarme y darme todo su apoyo y cariño a lo largo de toda la carrera.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO	V
LISTADO DE CUADROS	VII
LISTADO DE FIGURAS.....	XI
LISTADO DE ECUACIONES.....	XVIII
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT.....	XX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. JUSTIFICACIÓN	5
IV. MARCO TEÓRICO.....	7
V. ANTECEDENTES.....	35
VI. METODOLOGÍA.....	40
VII. RESULTADOS	66
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	84
IX. CONCLUSIONES	116
X. RECOMENDACIONES	117
XI. BIBLIOGRAFÍA	119
XII. ANEXOS	126

LISTADO DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Comparación de la duración de cada fase del crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno	72
Cuadro 2. Comparación del tiempo de generación, productividad y rendimiento de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno	72
Cuadro 3. Comparación de la biomasa recuperada, su rendimiento y el aceite recuperado de la producción de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno	73
Cuadro 4. Parámetros cinéticos del modelo matemático que describe el crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L obtenidos con el Software Berkley Madonna®	74
Cuadro 5. Porcentaje de lisis celular promedio de las microalgas <i>N. oculata</i> tratadas bajo distintos métodos de lisis celular	81
Cuadro 6. Porcentaje promedio de recuperación de aceite vegetal utilizando distintos métodos de extracción con solventes	83
Cuadro 7. Concentración molar de los nutrientes necesarios para preparar el medio f/2 Guillard	126
Cuadro 8. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	127
Cuadro 9. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	128
Cuadro 10. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	130
Cuadro 11. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	131
Cuadro 12. Conteos celulares realizados para la fermentación 3 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	133
Cuadro 13. Mediciones de variables realizados para la fermentación 3 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	134
Cuadro 14. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	135

Cuadro 15. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L	137
Cuadro 16. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	138
Cuadro 17. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L	139
Cuadro 18. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	141
Cuadro 19. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L	142
Cuadro 20. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	143
Cuadro 21. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L	145
Cuadro 22. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	146
Cuadro 23. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L	147
Cuadro 24. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	149
Cuadro 25. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L	150
Cuadro 26. Biomasa recuperada de las fermentaciones en los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno	151
Cuadro 27. Aceite de microalgas <i>N. oculata</i> recuperado de las fermentaciones en los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno	152
Cuadro 28. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular de estrés mecánico inducido por licuadora	152
Cuadro 29. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular por ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	153

Cuadro 30. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular por ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	153
Cuadro 31. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M.....	154
Cuadro 32. Viabilidad celular obtenida bajo el tratamiento del método de lisis celular conformado por la combinación de estrés mecánico con licuadora y ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda aplicados por el mismo intervalo de tiempo (7.5 minutos)	155
Cuadro 33. Viabilidad celular obtenida bajo el tratamiento del método de lisis celular conformado por la combinación de estrés mecánico con licuadora y ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda aplicados por el mismo intervalo de tiempo (15 minutos)	155
Cuadro 34. Aceite vegetal de la marca Ideal recuperado mediante distintos métodos de recuperación de aceite por solventes.....	156
Cuadro 35. Solución de nitrato de sodio preparada y cantidades necesarias para las distintas concentraciones iniciales de nitrato para las fermentaciones.....	157
Cuadro 36. Soluciones y sus cantidades para preparar medio f/2 Guillard.....	157
Cuadro 37. Nutrientes y sus cantidades para preparar 1 L de solución de trazas de metal.....	158
Cuadro 38. Nutrientes y sus cantidades para preparar 1 L de solución de vitaminas	158
Cuadro 39. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 250 mL de la solución de cloroformo:metanol (2:1).....	159
Cuadro 40. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 250 mL de la solución de cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)	159
Cuadro 41. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 250 mL de la solución de etanol:hexano (1:1).....	159
Cuadro 42. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 1 L de la solución de ácido clorhídrico 1 M.....	160
Cuadro 43. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00	160
Cuadro 44. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00.....	162
Cuadro 45. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00.....	163
Cuadro 46. Desviaciones porcentuales y estándar para las medidas de células viables, nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00.....	165
Cuadro 47. Promedio de las desviaciones porcentuales de las células viables y nitratos totales para cada fase del crecimiento celular para todas las fermentaciones a cualquier concentración inicial de la fuente de nitrógeno	166
Cuadro 48. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00.....	167
Cuadro 49. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50	169

Cuadro 50. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50.....	170
Cuadro 51. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50.....	172
Cuadro 52. Desviaciones estándar para las medidas de pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50	173
Cuadro 53. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50.....	175
Cuadro 54. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25	176
Cuadro 55. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25.....	178
Cuadro 56. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25	179
Cuadro 57. Desviaciones estándar para las medidas de pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25	180
Cuadro 58. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25.....	182
Cuadro 59. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.10	183
Cuadro 60. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.10.....	185
Cuadro 61. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.10.....	186
Cuadro 62. Desviaciones estándar para las medidas de pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.10	187
Cuadro 63. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.10.....	189
Cuadro 64. Coeficientes R^2 de las células viables y los nitratos totales, entre datos experimentales y datos calculados con Berkeley Madonna, para las fermentaciones a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno	190
Cuadro 65. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a estrés mecánico por licuadora a distintos tiempos de tratamiento	191
Cuadro 66. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda a distintos tiempos de tratamiento	191
Cuadro 67. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda a distintos tiempos de tratamiento	192
Cuadro 68. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a hidrólisis ácida por ácido clorhídrico a distintos tiempos de tratamiento.....	193

Cuadro 69. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda y estrés mecánico por licuadora a distintos tiempos de tratamiento.....	193
Cuadro 70. Porcentaje de recuperación de aceite con los distintos métodos de extracción de aceite con solventes.....	194
Cuadro 71. Balance de masa de las entradas de los sistemas fermentativos.....	195
Cuadro 72. Balance de masa de las salidas de los sistemas fermentativos.....	195

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> observada en microscopio.....	7
Figura 2 Representación esquemática de la célula y pared celular de las microalgas del género <i>Nannochloropsis</i>	9
Figura 3. Representación esquemática de la pared celular de las microalgas del género <i>Nannochloropsis</i>	9
Figura 4. Fotosíntesis en células vegetales.	10
Figura 5. Estructura química de un triacilglicerol.....	11
Figura 6. Ruta metabólica de la síntesis de lípidos en microalgas.....	12
Figura 7. Especiación del dióxido de carbono en disolución.....	14
Figura 8. Ejemplo de un fotobiorreactor tubular.....	18
Figura 9. Ejemplo de fotobiorreactor de panel plano.....	19
Figura 10. Ejemplo de fotobiorreactor de columna.	20
Figura 11. Coeficientes de partición en una mezcla de octanol/agua para distintos solventes.	25
Figura 12. Estructuras de la membrana plasmática de <i>Nannochloropsis</i> sp. en presencia de solventes hidrofílicos (a) e hidrofóbicos (b).	26
Figura 13. Resumen de las frecuencias de estiramiento IR	29
Figura 14. Representación de la curva de crecimiento de microorganismos como las microalgas. A: fase de adaptación; B: fase de aceleración; C: fase de crecimiento exponencial; D: fase de desaceleración; E: fase estacionaria; F: fase de muerte.....	31
Figura 15. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento en la concentración del sustrato limitante.	33
Figura 16. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitrógeno de 0.300 g NaNO ₃ /L (x1.00)66	
Figura 17. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitrógeno de 0.150 g NaNO ₃ /L (x0.50)67	
Figura 18. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitratos de 0.075 g NaNO ₃ /L (x0.25)...	68

Figura 19. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitratos de 0.030 g NaNO ₃ /L (x0.10)...	69
Figura 20. Comparación del crecimiento celular promedio de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno.....	70
Figura 21. Comparación del consumo de nitrato promedio de las microalgas <i>N. oculata</i> bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno.....	71
Figura 22. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga <i>N. oculata</i> y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	77
Figura 23. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga <i>N. oculata</i> y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	78
Figura 24. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga <i>N. oculata</i> y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	79
Figura 25. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga <i>N. oculata</i> y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	80
Figura 26. Muestra de microalgas <i>Nannochloropsis oculata</i> obtenida del reactor de laguna abierta de la Universidad del Valle de Guatemala analizada en cámara de Neubauer bajo microscopio a 10x.	203
Figura 27. Sistema de dos fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L marca Biovantage utilizado para las fermentaciones.....	203
Figura 28. Fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L con 5 L de medio de cultivo f/2 Guillard modificado	204
Figura 29. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00	204
Figura 30. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50	205
Figura 31. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25	205
Figura 32. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10	206

Figura 33. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00.....	206
Figura 34. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50.....	206
Figura 35. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25.....	207
Figura 36. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10.....	207
Figura 37. Muestras de líquido recuperado de la destilación para la extracción de aceite de la biomasa obtenida en las distintas fermentaciones.....	207
Figura 38. Líquido con presencia de aceite vegetal recuperado de la destilación para recuperar aceite de la biomasa producida en la fermentación bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00.....	208
Figura 39. Espectro IR del aceite vegetal marca Ideal.....	208
Figura 40. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00.....	209
Figura 41. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50.....	209
Figura 42. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25.....	210
Figura 43. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10.....	210
Figura 44. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> sin daño celular observado en el microscopio a 40x.....	211
Figura 45. Perfil de población y viabilidad obtenido con el equipo MUSE para el inóculo 1.....	211
Figura 46. Perfil de población y viabilidad obtenido con el equipo MUSE para el inóculo 2.....	211
Figura 47. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 15 minutos.....	212
Figura 48. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 15 minutos.....	212
Figura 49. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 15 minutos.....	212
Figura 50. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 15 minutos.....	213
Figura 51. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 15 minutos.....	213

Figura 52. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 15 minutos.....	213
Figura 53. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 15 minutos	214
Figura 54. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 15 minutos	214
Figura 55. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 7.5 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 7.5 minutos	214
Figura 56. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 7.5 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 7.5 minutos	215
Figura 57. Cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 15 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 15 min	215
Figura 58. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 15 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 15 min	215
Figura 59. Espectro IR del aceite recuperado con el método de solventes cloroformo:metanol (2:1).....	216
Figura 60. Espectro IR del aceite recuperado con el método de solventes cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)	216
Figura 61. Espectro IR del aceite recuperado con el método de solventes etanol:hexano (1:1) ..	217
Figura 62. Aceites recuperados con distintos métodos de extracción de aceites con solventes...	217
Figura 63. Reactor abierto tipo laguna de la Universidad Del Valle de Guatemala	218
Figura 64. Sal de acuario PRODAC	218
Figura 65. Sobres NitraVer 5 Nitrate Reagent para la cuantificación de nitratos con el equipo HACH DR 890.....	218
Figura 66. Aceite vegetal marca Ideal	219
Figura 67. Barómetro	219
Figura 68. Autoclave Tuttnauer	219
Figura 69. Equipo MUSE	220
Figura 70. Medio de cultivo previo a centrifugación	220
Figura 71. Medio de cultivo posterior a la centrifugación	220
Figura 72. Centrifuga SORVALL RT7.....	221
Figura 73. Recuperación de biomasa húmeda	221

Figura 74. Secado de biomasa en horno	221
Figura 75. Horno secador Symphony	222
Figura 76. Lisis celular inducida con estrés mecánico por licuadora de la biomasa recuperada .	222
Figura 77. Biomasa posterior al tratamiento de lisis celular mezclada con solventes para la extracción de aceite.....	222
Figura 78. Decantación de biomasa en solvente	223
Figura 79. Kit de destilación para la recuperación de solventes y aceite.....	223
Figura 80. Muestra de cultivo de microalgas previo a la lisis celular por estrés mecánico con licuadora.....	223
Figura 81. Muestra de cultivo de microalgas posterior a la lisis celular por estrés mecánico con licuadora.....	224
Figura 82. Procesador ultrasónico dr. Hielscher UP100H	224
Figura 83. Sistema para realizar lisis celular mediante ultrasonido.....	224
Figura 84. Muestra de microalgas sometida a lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico.....	225
Figura 85. Biomasa seca utilizada en los métodos de extracción de aceite con solventes.....	225
Figura 86. Biomasa seca con aceite vegetal Ideal para la recuperación de aceite con solventes .	225
Figura 87. Mezcla de biomasa seca y aceite vegetal Ideal con solventes	226
Figura 88. Decantación de biomasa seca con aceite vegetal Ideal en solventes	226
Figura 89. Kit de destilación para la recuperación de solventes y aceite vegetal Ideal	226
Figura 90. Equipo HACH DR890 utilizado para la cuantificación de nitratos en el medio de cultivo	227
Figura 91. Medidor salino ATAGO utilizado para cuantificar el porcentaje de salinidad en el medio de cultivo.....	227
Figura 92. Potenciómetro PCS Testr 35 utilizado para medir el pH del medio de cultivo	227
Figura 93. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE.....	228
Figura 94. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE.....	228
Figura 95. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE.....	228
Figura 96. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE.....	229
Figura 97. Conteo celular del día 0 de la fermentación 3 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE.....	229
Figura 98. Conteo celular del día 21 de la fermentación 3 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE.....	229
Figura 99. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE.....	230

Figura 100. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE.....	230
Figura 101. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE.....	230
Figura 102. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE.....	231
Figura 103. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE.....	231
Figura 104. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE.....	231
Figura 105. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE.....	232
Figura 106. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE.....	232
Figura 107. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE.....	232
Figura 108. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE.....	233
Figura 109. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE.....	233
Figura 110. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE.....	233
Figura 111. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas N. oculata posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 5 minutos.....	234
Figura 112. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas N. oculata posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 10 minutos.....	234
Figura 113. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas N. oculata posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 5 minutos.....	234
Figura 114. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas N. oculata posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 10 minutos.....	235
Figura 115. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas N. oculata posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 5 minutos.....	235
Figura 116. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas N. oculata posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 10 minutos.....	235

Figura 117. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 5 minutos	236
Figura 118. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas <i>N. oculata</i> posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 10 minutos	236
Figura 119. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.	237
Figura 120. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50	237
Figura 121. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25	238
Figura 122. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10	238

LISTADO DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Velocidad de crecimiento celular.....	31
Ecuación 2. Velocidad de crecimiento celular específica.....	32
Ecuación 3. Tasa de división celular.....	32
Ecuación 4. Velocidad de crecimiento celular específica expresada con la tasa de división celular.	32
Ecuación 5. Modelo de Monod: velocidad de crecimiento celular específica.....	32
Ecuación 6. Modelo de Contoi: velocidad de crecimiento celular específica.....	34
Ecuación 7. Modelo de Moser: velocidad de crecimiento celular específica.....	34
Ecuación 8. Modelo cinético de Contoi propuesto por Aguilera, 2021.....	36
Ecuación 9. Modelo cinético de Contoi propuesto por Leong, 2021.....	37
Ecuación 10. Modelo de Monod propuesto por Gharagozloo y colaboradores, 2014.....	37
Ecuación 11. Modelo de Monod final propuesto por Gharagozloo y colaboradores, 2014.....	38
Ecuación 12. Modelo matemático que describe la velocidad específica de crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	73
Ecuación 13. Modelo matemático que describe la velocidad del crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	73
Ecuación 14. Modelo matemático que describe la velocidad del consumo del sustrato limitante para el crecimiento celular de las microalgas <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	74
Ecuación 15. Modelo matemático que describe el cambio de la concentración celular en el tiempo para el cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	74
Ecuación 16. Modelo matemático que describe el cambio de la concentración del sustrato limitante en el tiempo para el cultivo de microalgas <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.....	74
Ecuación 17. Modelo de Droop: velocidad de crecimiento celular específica.....	101

RESUMEN

Las microalgas producen aceite vegetal, el cual es una alternativa a los combustibles fósiles. Incluso su producción, al ser de 95 000 litros por hectárea, es de una a dos magnitudes más grandes que cualquier producción a partir de otros cultivos energéticos. Sin embargo, aún no se cuentan con estudios para entender qué condiciones generan la mayor producción de lípidos dentro de las microalgas y aún no se han maximizado los procesos de lisis celular y extracción de aceites, para hacer que la producción industrial de aceites sea eficiente y estos puedan ser aprovechados como biodiésel.

En el presente trabajo se enfocó en el uso de dos fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L para el cultivo de las microalgas *Nannochloropsis oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de nitrato de sodio, como fuente de nitrógeno, para evaluar cuál es la que permite producir la mayor cantidad de lípidos dentro de las microalgas. Se obtuvo que la concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 1.00$ (0.300 g NaNO_3/L) permite obtener la mayor producción de biomasa, siendo esta de $12.5005 \text{ g} \pm 0.0193 \text{ g}$. Sin embargo, la concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 0.10$ (0.030 g NaNO_3/L) permite obtener el mayor rendimiento de biomasa, el cual es de $72.4731 \text{ g biomasa/g NO}_3$. A pesar de esto, no se logró recuperar aceite vegetal de la biomasa cosechada del cultivo de las microalgas, lo cual puede deberse a una baja producción de aceite y posterior pérdida en la extracción de este. Asimismo, se desarrolló y parametrizó un modelo cinético, basado en el modelo de Monod, para describir el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su respectivo consumo del sustrato limitante: nitrato, a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, en los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L.

Por el otro lado, se concluyó que el mejor método para inducir la disrupción de la pared celular de las microalgas *N. oculata* es el estrés mecánico inducido por la licuadora en un tiempo total de 15 minutos, puesto que genera un porcentaje de lisis celular del $12.56 \pm 0.90 \%$. Por último, se concluyó que el mejor método para recuperar aceite vegetal es el método de solventes que utiliza la combinación cloroformo:metanol (2:1), ya que permite recuperar un $89.4612 \pm 2.2274 \%$ del aceite vegetal.

ABSTRACT

Microalgae produce vegetable oil, which is an alternative to fossil fuels. Even their production, at 95,000 liters per hectare, is one to two magnitudes greater than any production from other energy crops. However, there are still no studies to understand what conditions generate the greatest production of lipids within microalgae and the processes of cell lysis and oil extraction are not yet maximized, to make the industrial production of oils efficient and take advantage of these as biodiesel.

The present work focused on the use of two 8 L ascending bubble column photobioreactors for the cultivation of *Nannochloropsis oculata* microalgae under different initial concentrations of sodium nitrate as a nitrogen source, to evaluate which one allows producing the highest amount of lipids within the microalgae. It was obtained that the initial concentration of the x1.00 nitrogen source (0.300 g NaNO₃/L) allows obtaining the highest biomass production, being 12.5005 g ± 0.0193 g. However, the initial concentration of the nitrogen source x0.10 (0.030 g NaNO₃/L) allows obtaining the highest biomass yield, which is 72.4731 g biomass/g NO₃. Despite this, it was not possible to recover vegetable oil from the biomass harvested from the microalgae culture, which may be due to low oil production and subsequent loss in oil extraction. Likewise, a kinetic model was developed and parameterized, based on the Monod model, to describe the cell growth of *N. oculata* microalgae and their respective consumption of the limiting substrate: nitrate, at different initial concentrations of the nitrogen source, in the 8 L ascending bubble column photobioreactors.

On the other hand, it was concluded that the best method to induce cell wall disruption of *N. oculata* microalgae is the mechanical stress induced by the blender in a total time of 15 minutes, since it generates a cell lysis percentage of 12.56 ± 0.90 %. Finally, it was concluded that the best method to recover vegetable oil is the solvent method using the chloroform:methanol (2:1) combination, since it allows recovering 89.4612 ± 2.2274 % of the vegetable oil.

I. INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles de tercera generación se han vuelto de gran interés, ya que representan una alternativa a los combustibles fósiles y requieren de materia prima que no representa un peligro para la seguridad alimentaria. Por ende, la comunidad científica ha enfocado sus esfuerzos en maximizar la producción de lípidos a partir de las microalgas y en la extracción de dichos lípidos, para lograr escalar el proceso de una forma eficiente y sostenible. Actualmente países como Japón, España y Cuba ya están desarrollando las tecnologías para llevar a una escala industrial el crecimiento de microalgas para la obtención de aceites y otros productos con potencial en agricultura, nutrición, cosmética y la creación de biocombustibles (Moreno *et al.*, 2016). Sin embargo, en Guatemala aún se están desarrollando investigaciones en esta rama, por lo que no se cuenta con tecnologías desarrolladas para la producción industrial de microalgas.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, es decir que aprovechan la luz solar para producir energía química para su metabolismo y tienen la capacidad de fijar el dióxido de carbono (Chisti, 2007). Una de las especies más utilizadas en la industria, debido a su alto valor nutricional y su tolerancia a los cambios ambientales, es *Nannochloropsis oculata*. Estas microalgas cuenta con el mayor contenido de ácidos grasos, en especial de los triacilgliceroles (TAG's) lo cual las hace ideal para la producción de biodiesel (Sánchez-Torres *et al.*, 2008; Chisti, 2007). El contenido lipídico de las microalgas *N. oculata* al ser cultivadas en agua marina alcanza un 22.7% a 29.7% del peso seco, pero bajo condiciones de privación de nutrientes puede alcanzar hasta un 65% o 70% del peso seco. Asimismo, su productividad lipídica puede llegar a ser de 84.0 a 142 mg/Ld (Hu, 2004; Tamburic *et al.*, 2014). Sin embargo, la producción de lípidos depende en gran medida de las condiciones de ambientales, así como del tipo de biorreactor en el que está siendo cultivada la microalga. Los factores con más impacto en la producción de lípidos son: la disponibilidad de nutrientes en el medio, en especial la deficiencia de nitrógeno, salinidad, fuente e intensidad de luz, pH, temperatura y niveles de oxígeno disuelto (Bi & He, 2020).

Una de las formas que se utilizan para cultivar a las microalgas *N. oculata* es mediante un fotobiorreactor de columna. Estos fotobiorreactores están hechos en forma de columna vertical y con materiales como vidrio transparente o acrílico. Cuentan con un sistema de burbujeo de aire en la parte inferior, lo cual crea turbulencia para mezclar adecuadamente el medio de cultivo y lograr la transferencia de masa de dióxido de carbono y oxígeno producido. Asimismo, las fuentes de luz pueden ser instaladas interna o externamente para proveer una mejor distribución de luz. Las principales ventajas de estos reactores es que permiten una alta transferencia de masa, una baja

fotoinhibición y fotooxidación, las condiciones de cultivo son altamente controlables, se obtienen altos rendimientos de biomasa, las columnas son compactas, fáciles de mantener y de bajo costo energético. Por ende, este tipo de reactores cuentan con una alta escalabilidad para la industria (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020).

También es importante conocer y analizar la cinética del crecimiento celular de las microalgas en las condiciones experimentales dentro de los fotobiorreactores de columna ascendente. La cinética puede obtenerse al medir con el paso del tiempo la concentración celular, la concentración del sustrato limitante y, de ser posible, la concentración del producto de interés. El análisis permitirá obtener la tasa de crecimiento celular, entre otros parámetros cinéticos importantes, como la velocidad específica de crecimiento (μ) y el espacio-tiempo (τ). Con esto se puede predecir el crecimiento celular de las microalgas bajo distintos parámetros experimentales. Todo esto resulta útil para el escalamiento de los fotobiorreactores, puesto que el tiempo de reacción debe permanecer constante en la nueva escala y se puede producir microalgas bajo las condiciones que generen los mejores rendimientos.

Cabe resaltar que se requiere de métodos de lisis celular para lograr que las células liberen su contenido y así extraer posteriormente los lípidos producidos dentro de las microalgas. Entre los métodos más utilizados para la lisis celular están: estrés mecánico, ultrasonido, shock osmótico, termólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, entre otros. Cabe resaltar que estos métodos permiten debilitar y/o romper la pared celular de las microalgas (McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013). Por el otro lado, uno de los métodos más utilizados para la extracción de lípidos es el Método de Bligh & Dyer. Este consiste en utilizar una relación 2:1 de los solventes cloroformo:metanol, lo cual permite la formación de una mezcla bifásica, donde los lípidos quedan en la fase del cloroformo y los demás compuestos en la fase del metanol (Wong *et al.*, 2019). Una alternativa a este método, que ha reportado buenos rendimientos, es utilizar los solventes cloroformo:metanol:agua, en una proporción (5.7:3:1). Además, el uso de solventes verdes o amigables con el medio ambiente han tomado cada vez más importancia, por lo que han surgido investigaciones en donde se utiliza solventes como el n-hexano o la combinación de hexano y etanol (1:1). Estos generan un menor impacto ambiental a la vez que generan buenos rendimientos en la extracción de lípidos (De Jesús & Filho, 2020).

El presente trabajo se enfocó en el uso de dos fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente, con capacidad de 8 L cada uno, para la evaluación de la producción de lípidos utilizando las microalgas *Nannochloropsis oculata*. En el apartado de objetivos se detalla los aspectos evaluados, los cuales se llevaron a cabo según los descritos en el apartado de metodología

y tomando como base los fundamentos teóricos y prácticos presentados en el marco teórico y en antecedentes, respectivamente. En el apartado de resultados se expone los datos más relevantes obtenidos de la experimentación, los cuales son discutidos en el apartado de análisis de resultados. Por último, en el apartado de conclusiones se presenta, en base a dicho análisis, el modelo cinético propuesto para predecir el crecimiento de las microalgas bajo los parámetros experimentales analizados, así como las condiciones de cultivo, el método de lisis celular y el método de solventes para extraer lípidos, que permiten obtener los mejores rendimientos.

II. OBJETIVOS

A. General

Evaluar la producción de lípidos utilizando *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente, para determinar los parámetros experimentales que generan los mejores rendimientos.

B. Específicos

1. Medir la concentración inicial de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, para determinar la que permite obtener una mayor producción de lípidos, midiendo en diferentes tiempos la concentración celular, la concentración de la fuente de nitrógeno y la cantidad de lípidos obtenidos de la extracción.
2. Generar un modelo cinético de la operación del reactor, midiendo para diferentes tiempos la concentración celular y la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, para predecir el crecimiento celular de las microalgas *Nannochloropsis oculata* bajo los parámetros experimentales.
3. Evaluar la lisis celular de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, mediante métodos previamente estudiados y la cuantificación de células viables, para determinar el más efectivo.
4. Evaluar la extracción de lípidos de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, mediante métodos previamente estudiados y cuantificando la cantidad de lípidos extraídos, para determinar el que genera mejores rendimientos.

III. JUSTIFICACIÓN

Desde la Revolución Industrial, la disminución de los recursos naturales y el consecuente aumento de los gases de efecto invernadero (GEI) han ido en aumento (Mureed *et al.*, 2018). Según la Environmental Protection Agency (EPA), en 2017 se emitieron 50 mil millones de toneladas al año de GEI de fuentes antropogénicas, de los cuales el 14% eran debido al transporte (Environmental Protection Agency, 2017). Los científicos de todo el mundo, preocupados ante la alarmante situación del planeta, han enfocado sus esfuerzos en desarrollar alternativas para un progreso más sostenible. Entre dichas alternativas se encuentra el desarrollo de biocombustibles como sustitutos al petróleo y gas natural, ya que estos nuevos combustibles generan menos GEI (Mureed *et al.*, 2018).

Los biocombustibles han tenido un crecimiento exponencial en el mercado, alcanzando entre el año 2000 y 2011 un crecimiento del 400%. Por lo que innovar en esta área podría ser rentable (HLPE, 2013). Cabe agregar que el biodiesel se ha desarrollado a partir de fuentes alimentarias como aceites vegetales. Sin embargo, esto representa un peligro para la salud alimentaria, por lo que utilizar otras materias primas es indispensable; con el fin de obtener beneficios económicos a partir de fuentes renovables que no perjudiquen al medio ambiente, ni pongan en peligro la alimentación de los seres humanos (Mureed *et al.*, 2018; Maity *et al.*, 2014).

A raíz de esto surge el desarrollo de biocombustibles de tercera generación, los cuales se producen a partir del aceite de microalgas. Esta materia prima no pone en riesgo la salud alimentaria, es una fuente renovable y se puede cultivar a bajo costo. Incluso puede aprovecharse la biomasa residual para crear alimentos de valor (Maity *et al.*, 2014; HLPE, 2013). Por otro lado, se ha reportado que las microalgas producen aún más aceites que los cultivos energéticos utilizados para la producción de aceite vegetal. Se estima que la producción de biodiésel a partir de microalgas puede alcanzar los 95 000 litros por hectárea, lo cual es de una a dos magnitudes más grandes que cualquier producción a partir de otros cultivos (Ganesan *et al.*, 2020).

Actualmente en diversos países ya están desarrollando las tecnologías para llevar a una escala industrial el crecimiento de microalgas para la obtención de aceites y otros productos con potencial en agricultura, nutrición, cosmética y la creación de biocombustibles (Moreno *et al.*, 2016). Sin embargo, en Guatemala no se cuenta con tecnologías desarrolladas para la producción industrial de microalgas, ya que aún se están desarrollando investigaciones en esta rama. Específicamente, en Universidad del Valle de Guatemala, se han llevado a cabo investigaciones para la producción de

las microalgas *Nannochloropsis oculata*, ya que estas cuenta con un gran valor nutricional y con un alto contenido de ácidos grasos, lo cual las hace de interés para la industria.

A pesar de estos primeros esfuerzos, aún no se cuentan con estudios para entender qué condiciones generan la mayor producción de lípidos dentro de las microalgas y aún no se maximizan los procesos de lisis celular y extracción de aceites, para hacer que la producción industrial de aceites sea eficiente y estos puedan ser aprovechados como biodiésel. Es por esto que en el presente trabajo, se propone determinar la concentración inicial de nitrato de sodio, como fuente de nitrógeno, que genera la mayor producción de lípidos dentro de las microalgas *N. oculata*, cultivadas en los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L que se utilizan en la Universidad del Valle de Guatemala. Además, se propone un modelo cinético para predecir el crecimiento de las microalgas en distintas condiciones experimentales, un método de lisis celular funcional y un método de extracción de lípidos con solventes, como medios de proveer información técnica necesaria en el desarrollo de dicho proceso.

IV. MARCO TEÓRICO

A. MICROALGAS *NANNOCHLOROPSIS OCULATA*

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, es decir que aprovechan la luz solar para producir energía química para su metabolismo. Además, tienen la capacidad de fijar el dióxido de carbono (Chisti, 2007). Una de las especies más utilizadas en la industria, debido a su alto valor nutricional y su tolerancia a los cambios ambientales, es *Nannochloropsis oculata*. Además, el género *Nannochloropsis* es el que cuenta con el mayor contenido de ácidos grasos, en especial del triacilgliceroles (TAG's), lo cual la hace ideal para la producción de biodiesel (Sánchez-Torres *et al.*, 2008; Chisti, 2007).

La especie de microalga *Nannochloropsis oculata* proviene de la familia *Monodopsidaceae* y de la clase *Eustigmatophyte*. Es unicelular, su estructura se caracteriza por ser esférica o cilíndrica, alcanzado a medir los 2 a 4 μm (ver Figura 1). Cabe resaltar que son microorganismos no móviles, su estructura intercelular es bastante simple y sus cloroplastos presentan una coloración amarilla o verde. Otra de las características que diferencian a esta microalga de las demás es su contenido en clorofila "a", pero su falta de clorofila "b" y "c". Asimismo, cuenta con altas concentraciones de pigmentos tales como astaxantina, zeaxantina y canthaxantina (Guiry, 2013). Cabe agregar que el ambiente más común en el que puede encontrarse esta especie son en las aguas marinas, seguido de aguas dulces y salobres (Fawley & Fawley, 2007). Por otro lado, es importante mencionar que las microalgas se producen generalmente de forma asexual mediante bipartición y, en el caso de las células eucariotas, demoran entre 8 a 24 horas en duplicarse (Guzman-Burneo & González, 2016).

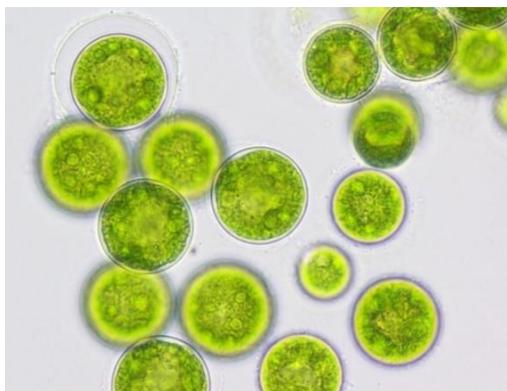


Figura 1. Microalga *Nannochloropsis oculata* observada en microscopio. (Daniells, 2015).

Es importante recalcar que la pared celular del género de microalgas *Nannochloropsis* es gruesa y fuerte, alcanzando a medir entre 0.06 a 0.11 μm de profundidad. La pared celular se conforma de distintas capas con diferentes composiciones y funciones. Las principales funciones de la pared celular son proteger a la célula de presiones externas y formar barreras de transferencia de masa para evitar la deshidratación celular y la extracción de biomoléculas (Zhang *et al.*, 2019). Por el otro lado, se ha reportado que el género *Nannochloropsis* cuenta con una capa interna en la pared celular que es porosa, con subestructuras fibrosas y filamentos, que soportan presión en ambos lados de su estructura y que conectan la capa con la membrana plasmática. Dicha capa está conformada principalmente por celulosa y glucosa. Sobre esta capa se encuentra otra compuesta en un 75% de celulosa y sobre esta se forma la capa externa de la pared celular, conformada por algaenano.

Este compuesto es un polímero alifático, insoluble, no hidrolizable y muy resistente, que es responsable en gran parte de la dureza de la pared celular. Los algaenanos se conforman por cadenas rectas de hasta 30 carbonos, altamente saturadas y unidas por enlaces éter en la posición terminal y en una o dos posiciones de la cadena media. Cabe agregar que sobre la capa de algaenano se encuentran extensiones de la pared cuya composición aún no se conoce con certeza (ver Figura 2 y 3). En síntesis, los componentes de la pared celular incluyen carbohidratos como: glucosa, ramnosa, manosa, ribosa, xilosa, fucosa y galactosa; aminoácidos, proteínas, lípidos, carotenoides, taninos, ligninas, celulosa, hemicelulosas, pectinas, fucanos, alginatos, ulanos, carragenanos y liqueninas. Por ende, las numerosas barreras de la pared celular provocan que la extracción de biomoléculas de estas microalgas sea complicado (Zhang *et al.*, 2019; D'Hond *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017).

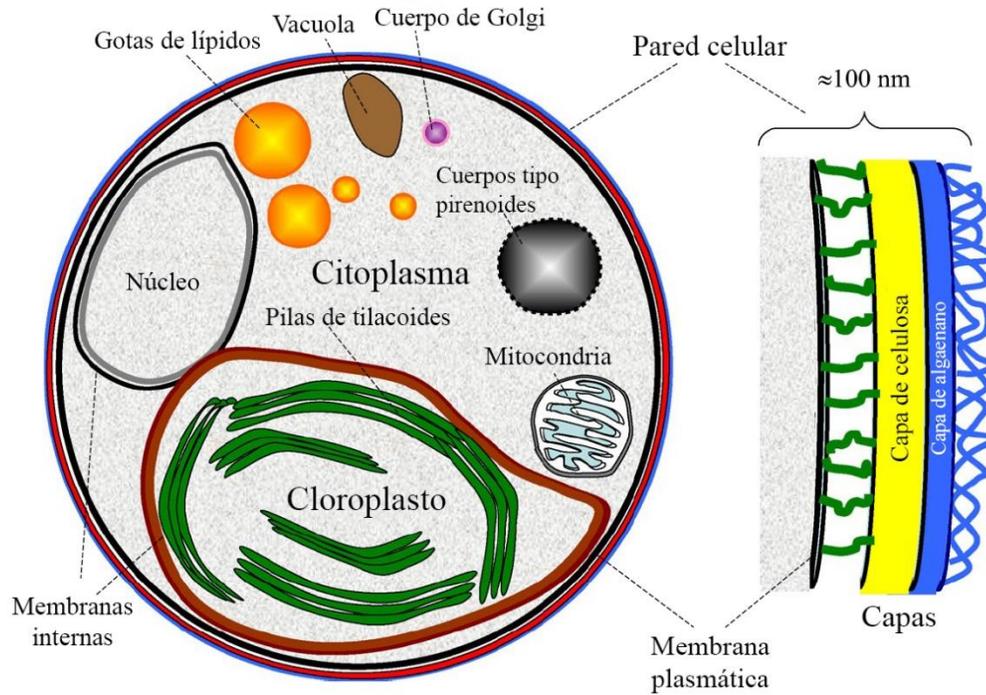


Figura 2 Representación esquemática de la célula y pared celular de las microalgas del género *Nannochloropsis*.

(Zhang et al., 2019).

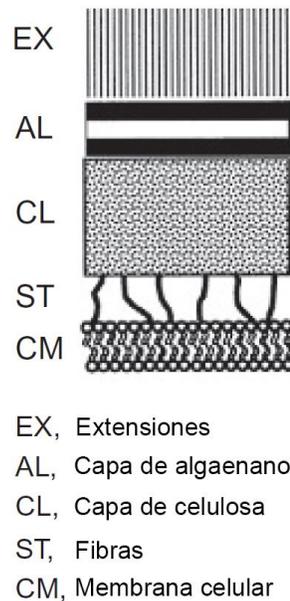


Figura 3. Representación esquemática de la pared celular de las microalgas del género *Nannochloropsis*.

(D'Hond et al., 2017).

Las microalgas *N. oculata* obtienen su energía mediante la fotosíntesis (ver Figura 4). Este es un proceso metabólico en el que se convierte el dióxido de carbono en carbohidratos, oxígeno y agua, que serán aprovechados por las microalgas para su desarrollo. Este proceso ocurre en los cloroplastos y se divide en dos fases: fase luminosa y fase oscura (ciclo de Calvin). En términos generales, en esta fase se requiere de 6 moléculas de agua y energía solar. Se produce 6 moléculas de O₂ y se forma ATP y NADPH, los cuales son moléculas que almacenan la energía. Por el otro lado, en la fase oscura se requiere de 6 moléculas de dióxido de carbono y de las moléculas de ATP y NADPH producidas en la fase anterior. Con estas se produce ADP y NADP⁺, las cuales se reutilizan en la fase luminosa y, por último, se produce gliceraldehído 3-fosfato (G3P), el cual es aprovechado por las células para producir glucosa y otros carbohidratos esenciales para el metabolismo. En síntesis, la ecuación general que describe la fotosíntesis es: $6 \text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{luz solar} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ (Audesirk *et al.*, 2012).

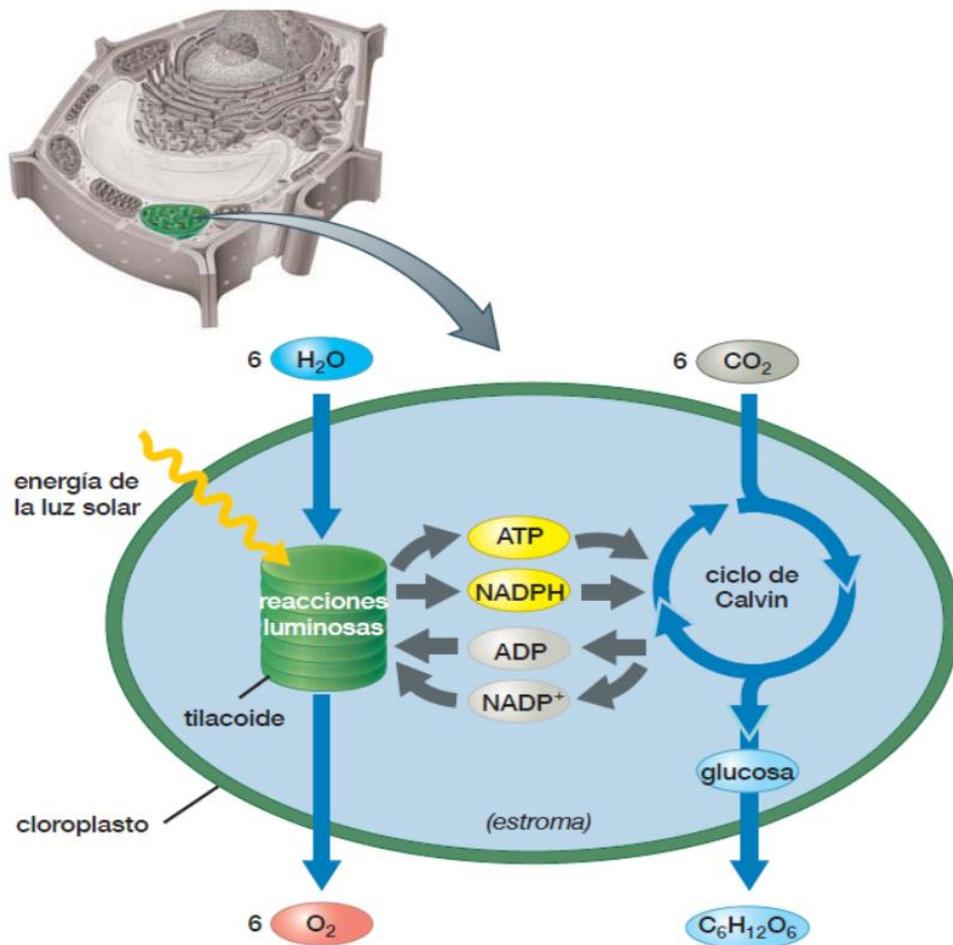


Figura 4. Fotosíntesis en células vegetales.

(Audesirk *et al.*, 2012).

Por otro lado, los lípidos producidos por las microalgas *N. oculata* se pueden dividir en dos grupos principales: lípidos polares y lípidos no polares. Los lípidos polares, como los glicerofosfolípidos, tienen gran relevancia en la estructura celular, en distintas rutas metabólicas y en la respuesta ante cambios ambientales. Estos cuentan con largas cadenas de ácidos grasos, las cuales pueden transformarse para obtener ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), pertenecientes a la familia de los omega-3, como ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y docosahexaenoico (DHA). En cambio, los lípidos no polares, como los triacilglicerol (TAG's), son importantes como reserva de energía en las células, en el metabolismo celular y en el mantenimiento celular. Los triacilglicerol son ésteres que se derivan del glicerol y cuentan con ácidos grasos (ver Figura 5). Estos son de gran interés para la producción de biodiésel gracias a su poder energético (Aratboni *et al.*, 2019; Wade, 2017).

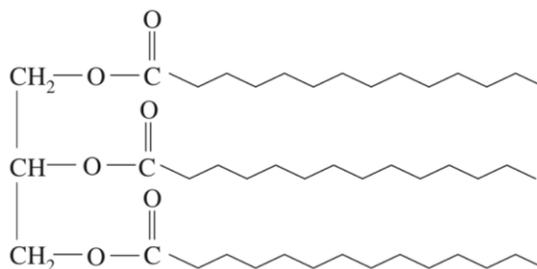


Figura 5. Estructura química de un triacilglicerol.

(Wade, 2017).

La síntesis de TAG's en las microalgas *N. oculata* ocurre mayormente en la fase estacionaria del crecimiento celular y, en términos generales, se da de la forma descrita a continuación (ver Figura 6). En primer lugar los ácidos grasos que se requieren como precursores son sintetizados en el cloroplasto mediante cualquiera de las dos formas: a partir del carbono fijado en la fotosíntesis o a partir de nutrientes orgánicos presentes en el medio de crecimiento de la microalga. Luego, los ácidos grasos libres son exportados desde el cloroplasto al retículo endoplasmático, en donde son convertidos en Acetil-CoA y luego en triacilglicerol (TAG). Por último, los TAG son transportados desde el retículo endoplasmático hacia el citoplasma en cuerpos oleosos, donde se conservan como reserva de energía. Cabe resaltar que son estas últimas moléculas las que se busca optimizar su producción para su posterior aprovechamiento, en especial en la producción de biodiésel (Hu *et al.*, 2008; Durrett, Benning & Ohlrogge, 2008).

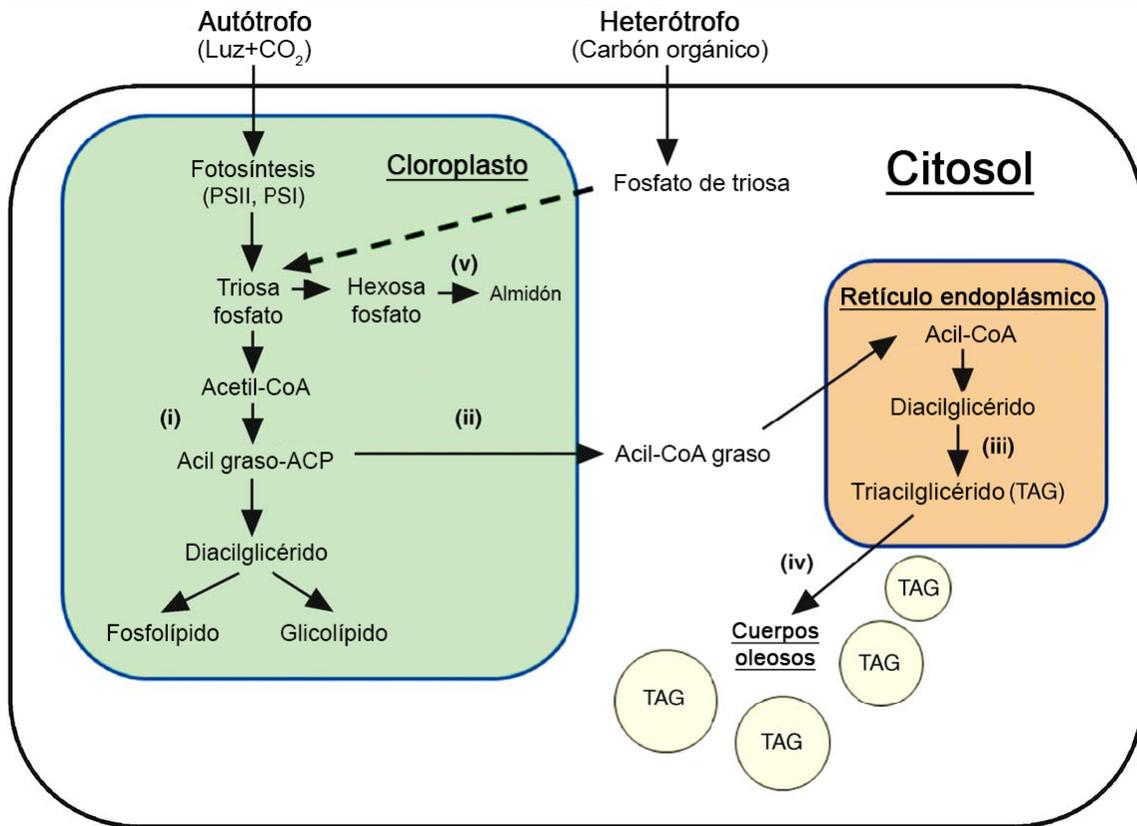


Figura 6. Ruta metabólica de la síntesis de lípidos en microalgas.

(Scott, 2010).

Cabe agregar que el contenido lipídico de las microalgas *N. oculata* al ser cultivadas en agua marina alcanza un 22.7% a 29.7% del peso seco, pero bajo condiciones de privación de nutrientes puede alcanzar hasta un 65% o 70% del peso seco. Asimismo, su productividad lipídica puede llegar a ser de 84.0 a 142 mg/Ld (Hu, 2004; Tamburic *et al.*, 2014). Sin embargo, la producción de lípidos depende en gran medida de las condiciones ambientales, así como del tipo de biorreactor en el que está siendo cultivada la microalga. Los factores con más impacto en la producción de lípidos son: la disponibilidad de nutrientes en el medio, en especial la deficiencia de nitrógeno, salinidad, fuente e intensidad de luz, pH, temperatura y niveles de oxígeno disuelto (Bi & He, 2020).

B. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Luz: Esta es la condición más importante que debe controlarse para que las microalgas realicen adecuadamente la fotosíntesis y alcancen la máxima tasa de crecimiento y producción de biomasa. De lo contrario, se puede inducir una fotoinhibición y provocar la muerte de los microorganismos (Tamburic *et al.*, 2014). Por eso, la iluminación debe concentrarse en las intensidades y los fotoperíodos adecuados. Estas variables también dependerán del biorreactor utilizado y de la profundidad del cultivo (Ganesan *et al.*, 2020).

Las microalgas *Nannochloropsis* cuentan con un aparato fotosintético flexible, puesto que es capaz de adaptarse a una amplia gama de intensidades de luz a un ritmo constante o con variación sinusoidal y, por el otro lado, puede adaptarse a una alta frecuencia de fluctuaciones de irradiación (Tamburic *et al.*, 2014). Para optimizar el crecimiento de microalgas se puede utilizar lámparas fluorescentes con una radiación de 380 a 500 nm para brindar luz azul en conjunto con radiación de 600 a 700 nm para brindar luz roja. Asimismo, se puede variar la intensidad lumínica (Ganesan *et al.*, 2020). Cabe agregar que para el cultivo de *Nannochloropsis* son importantes los períodos de oscuridad después de períodos de luz intensa, para permitir la reoxidación de los transportadores de electrones clave en el aparato fotosintético (Tamburic *et al.*, 2014).

Temperatura: La temperatura óptima a la que crecen las microalgas y alcanzan la máxima producción de biomasa depende en parte al ambiente natural donde crecen. En la naturaleza, las microalgas están sujetas a variaciones de temperatura debido a su dependencia con la luz solar. Se ha reportado que en sistemas de cultivo abiertos la temperatura máxima puede llegar entre 35 a 38 °C y la temperatura mínima, ante la ausencia de luz solar, puede llegar entre los 15 y 20 °C. Estas variaciones representan un reto en la optimización de la producción de biomasa. Por ende, en el laboratorio se debe controlar los rangos de temperatura de modo que se alcance la máxima producción de biomasa, pero cuidando de no provocar una acelerada respiración celular por constantes temperaturas altas (Harrison *et al.*, 2010; Vonshak, 1997). La temperatura óptima a la que crecen las microalgas *Nannochloropsis sp.* está en el rango de 24 a 26 °C. Sin embargo, faltan estudios concluyentes en donde se compare el crecimiento de *Nannochloropsis sp* bajo temperaturas constantes en el laboratorio y bajo temperaturas variables en la naturaleza (Tamburic *et al.*, 2014).

pH: El pH debe ser al adecuado para permitir que las microalgas crezcan, de lo contrario, la pared celular de estos microorganismos puede colapsar y afectar o detener el crecimiento. El pH óptimo al que las microalgas *N. oculata* se desarrollan va en el rango de 7 a 9, al igual que la

mayoría de las algas. Sin embargo, es importante destacar que el suministro de dióxido de carbono, así como su consumo, determina el pH del medio de cultivo. Esto se debe a la especiación del dióxido de carbono en la disolución. Si en el medio de cultivo hay más dióxido de carbono del que las microalgas son capaces de fijar, la concentración de iones H^+ aumentará en el medio y provocará el aumento del pH. Por ende, debe controlarse el pH del medio para evitar que este lo acidifique y provoque que las microalgas no puedan desarrollarse (Harrison *et al.*, 2010; Ganesan *et al.*, 2020; Sánchez-Torres *et al.*, 2008).

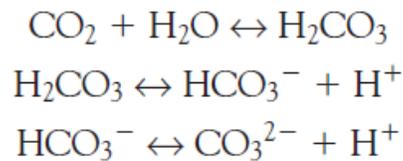


Figura 7. Especiación del dióxido de carbono en disolución.

(Harrison *et al.*, 2010).

Nitrógeno: Este nutriente se provee generalmente como nitratos, amonio o urea. Acorde a lo reportado por Guillard, 1975, la concentración de la fuente de nitrógeno que debe tener el medio de microalgas *N. oculata* es de 0.300 g/L. Además, este nutriente representa entre el 7% y 10% del peso seco de las microalgas y es esencial para la síntesis de proteínas estructurales y entre otras funciones de las células. Sin embargo, cuando en el medio de crecimiento este nutriente es escaso, a pesar de que la fotosíntesis continúa, pero en un ritmo más lento, el flujo de carbono se desvía de la síntesis de proteínas y se dirige a la síntesis de lípidos o carbohidratos, puesto que se sintetizan como reserva de energía y de carbono en las condiciones de estrés (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

La síntesis y acumulación de lípidos se maximiza en medios de cultivos con bajas concentraciones de nitrógeno. Bajo estas condiciones, los lípidos neutros, es decir, los triacilgliceroles (TAGs) predominan en el citoplasma de las células (Hu, 2004). Además, la deficiencia de nitrógeno conlleva a la acumulación de carotenoides secundarios y, en ocasiones, también se disminuye el contenido de clorofila. Sin embargo, es importante resaltar que cualquier factor de estrés al que se sometan las microalgas puede conllevar a la disminución de la productividad de la biomasa, a pesar de que se logre el objetivo de acumular lípidos (Aléman *et al.*, 2017).

Fósforo: Este nutriente también es indispensable para el correcto desarrollo de las microalgas. Su función es formar diversos componentes estructurales y funcionales para el crecimiento y diversos procesos metabólicos. Específicamente, es vital para la formación de ácidos nucleicos y para la transferencia de energía dentro de la célula (Hu, 2004; Park *et al.*, 2011). Cabe

resaltar que se provee en forma de fosfato de potasio y se requiere que el medio de cultivo contenga menos del 1% de fósforo (Park *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2010). Por otro lado, es importante mencionar que la deficiencia de este nutriente también provoca una deficiencia en el crecimiento de la biomasa (Park *et al.*, 2011). Además, las condiciones de estrés debido a la falta de este nutriente, provoca que el contenido de lípidos dentro de las células aumente (Scott, 2010).

Salinidad: Este parámetro es importante controlar para obtener la productividad de biomasa deseada, puesto que de lo contrario, la fotosíntesis en las microalgas puede verse inhibida por estrés osmótico. Se ha observado que, a pesar de que las microalgas pueden adaptarse en un medio con salinidad excesiva, la productividad de biomasa y, por ende, de lípidos decae debido a que la actividad fotosintética también decae (Hu, 2004). La salinidad recomendada en el medio de cultivo es del 20%, aunque las microalgas pueden llegar a ser bastante tolerantes, por lo que un rango del 12% al 40% de salinidad también puede ser adecuada dependiendo el objetivo del estudio (Castelló, 1993).

Dióxido de carbono: La concentración de dióxido de carbono influye en gran medida en la tasa de crecimiento de biomasa de las algas (Razzak *et al.*, 2015). Sin embargo, cabe mencionar que una limitante de esta tasa de crecimiento es la transferencia de masa de CO₂ en los biorreactores. Una solución viable es utilizar gas enriquecido con CO₂ para satisfacer los requerimientos de las células (Hu, 2004). Por el otro lado, el exceso de CO₂ en el medio también afecta la tasa de crecimiento de biomasa. Además, científicamente se ha comprobado que en un ambientes de crecimiento con exceso de aire enriquecido con CO₂ y transportado en burbujas, favorece a la producción de lípidos (Eloka & Inambao, 2017).

Oxígeno disuelto: Este nutriente se obtiene en el medio de cultivo mediante la fotosíntesis realizada por las microalgas. Es importante que este parámetro se pueda controlar en el medio de cultivo, de lo contrario pueden surgir diversas complicaciones en el crecimiento de las microalgas. El primer reto puede ser que, al haber alta concentración de oxígeno disuelto en el medio, las células pueden utilizarlo para realizar fotorrespiración, lo cual produce CO₂. Este compuesto puede cambiar el pH del medio y afectar el crecimiento óptimo de las microalgas (Alami *et al.*, 2020). El segundo reto puede ser que, debido a la alta concentración O₂, el crecimiento celular se vea inhibido. Esto puede deberse a que la radiación puede conllevar a la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden dañar a las células (Alami *et al.*, 2020). El tercer reto puede ser que los niveles de oxígeno disuelto en el medio aumenten hasta un 200% en las horas con mayor radiación, puesto que las microalgas la aprovechan al máximo para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, esta concentración de O₂ puede provocar que la producción de biomasa se reduzca un

17% o hasta un 25% en el caso que los niveles de oxígeno disuelto lleguen a un 300% (Park *et al.*, 2011).

C. MÉTODOS DE CULTIVO

Fototróficos: Las microalgas pueden seguir distintas rutas nutricionales. La primera de ellas es la ruta fototrófica. En esta las microalgas requieren de la luz solar y del dióxido de carbono atmosférico como fuente de carbono. Cabe agregar que algunas especies requieren además iones minerales inorgánicos y/o pequeñas cantidades de compuestos orgánicos, como las vitaminas, para crecer adecuadamente (Razzak *et al.*, 2015; Grobbelaar, 2004). La ventaja de esta ruta es que tanto la luz como el CO₂ es obtenido del ambiente, por lo que los costos son reducidos. Sin embargo, una desventaja es que, si las microalgas se exponen de forma prolongada a la luz solar puede haber fotoinhibición y, por ende, el crecimiento celular puede verse afectado. Cabe resaltar que en este tipo de cultivos debe cuidarse la densidad celular, puesto que si esta es muy alta, la luz solar no llegará de forma uniforme a todo el cultivo y también puede verse afectado el crecimiento celular (Borowitzka, 1999; Tamburic *et al.*, 2014).

Heterotróficos: En la ruta heterotrófica las microalgas no dependen de la luz solar para obtener energía, en su lugar, utilizan sustratos orgánicos, como glucosa, acetato y glicerol, como fuente de energía y fuente de carbono (Razzak *et al.*, 2015; Grobbelaar, 2004). Las ventajas de esta ruta es que, gracias a que ciertas especies de microalgas pueden crecer exclusivamente en ciertos sustratos orgánicos, se pueden utilizar biorreactores cerrados para producir biomasa y biocompuestos bajo condiciones controladas de cultivo y a un costo bajo (Grobbelaar, 2004; Borowitzka, 1999). Sin embargo, las desventajas de esta ruta es que hay pocas especies de microalgas, como *C. protothecoides* y *C. vulgaris*, que pueden crecer en estas condiciones. Además, las fuentes orgánicas de carbono pueden provocar contaminación por la presencia de otros microorganismos en el medio (Borowitzka, 1999).

Mixotróficos: En la ruta mixotrófica las microalgas requieren de la luz solar, del dióxido de carbono y de otros compuestos orgánicos para producir energía y crecer. Básicamente es una combinación entre las rutas fototróficas y heterotróficas, excepto en total oscuridad (Razzak *et al.*, 2015; Grobbelaar, 2004). Sin embargo, presenta ventajas sobre estas últimas dos rutas. La primera es que las microalgas no dependen por completo de la luz solar, por lo que la fotoinhibición es mínima. La segunda es que las microalgas no requieren grandes cantidades de compuestos orgánicos, por lo que su cultivo es más económico. La tercera es que las microalgas presentan

mayores tasas de crecimiento y, en los períodos de oscuridad, la pérdida de biomasa es mínima (Razzak *et al.*, 2015; Borowitzka, 1999). En la actualidad, este tipo de cultivo es ampliamente utilizado en la industria para producir biodiésel a partir de microalgas, debido a sus múltiples ventajas (Borowitzka, 1999).

Fotoheterotróficos: La ruta fotoheterotrófica es similar a la mixotrófica. Sin embargo, en esta las microalgas requieren de la luz solar para poder aprovechar los compuestos orgánicos como nutrientes, los cuales también van a contribuir con su crecimiento y sus requerimientos energéticos. La desventaja de esta ruta contra la mixotrófica es evidentemente el requerimiento esencial de luz solar, el cual puede provocar también una fotoinhibición y afectar el crecimiento celular (Razzak *et al.*, 2015; Grobbelaar, 2004; Tamburic *et al.*, 2014).

D. FOTOBIORREACTORES

Los fotobiorreactores son sistemas de cultivos en los que se aprovecha la ruta nutricional fototrófica o mixotrófica de las microalgas. Las características generales de estos biorreactores es que más del 90% de la luz no es proporcionada de forma directa sobre el cultivo, sino que esta atraviesa las paredes transparentes del biorreactor antes de llegar al cultivo. Por el otro lado, este tipo de biorreactor limita el intercambio de gases y contaminantes entre la atmósfera y el medio de cultivo, lo cual lo hace favorable para poder controlar las condiciones de crecimiento de las microalgas (Tredici, 2004). Actualmente, las investigaciones relacionadas al cultivo de microalgas utilizan los fotobiorreactores. Estos pueden ser diseñados como reactores tubulares, de panel plano o de columna. Este tipo de fotobiorreactores cuentan con grandes áreas superficiales, cortas trayectorias de luz interna y pequeñas zonas oscuras (Eriksen, 2008).

Fotobiorreactores tubulares: Este tipo de fotobiorreactor es considerado como uno de los más adecuados para cultivar microalgas a gran escala en un sistema cerrado al aire libre (ver Figura 7). Las características técnicas de este biorreactor son: tubos hechos de vidrio transparente o plástico, como polipropileno, acrílico o cloruro de polivinilo, las velocidades del líquido interno puede llegar a los 0.2 y 0.5 m/s, los tubos cuentan con diámetros internos pequeños, entre los 10 a 60 mm, para aumentar la penetración de la luz, los tubos pueden llegar a medir cientos de metros y pueden contar con distintas formas y orientaciones como vertical, horizontal, helicoidal e inclinado. Sin embargo, cabe destacar que la orientación horizontal cuenta con una relación superficie/volumen más grande y cuenta con el mejor ángulo para aprovechar la luz que la disposición vertical (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020).

Las principales ventajas de este fotobiorreactor es que son relativamente económicos, cuentan con una gran superficie de iluminación, permiten obtener buenas productividades de biomasa y permite un mejor tiempo de residencia del aire dentro de los tubos, por lo que hay más dióxido de carbono disuelto (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020). A pesar de esto, también existen desventajas al utilizar este tipo de biorreactor. Entre estas se encuentra el hecho que, si el diámetro del tubo es muy grande, puede restringir el crecimiento de las células, debido a que la luz solar no se provee de forma óptima. Por el otro lado, si los tubos son muy largos, puede provocar que no haya una adecuada transferencia de masa, lo que hace que exista altas concentraciones de dióxido de carbono disuelto en la zona de aireación y altas concentraciones de oxígeno disuelto en la zona de desgasificación, lo cual también puede inhibir la fotosíntesis. Cabe agregar que este biorreactor requiere de mucha energía, en ocasiones puede existir el agotamiento de CO₂, lo cual provoca gradientes de pH, puede haber incrustaciones, incluso las microalgas pueden crecer en las paredes de los tubos, restringiendo así la luz y, por ende, el crecimiento celular (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020).



Figura 8. Ejemplo de un fotobiorreactor tubular.

(Alami *et al.*, 2020).

Fotobiorreactores de panel plano: Estos biorreactores son rectangulares y delgados (ver Figura 8). Están hechos de vidrio transparente, plexiglás, policarbonato y película de luz óptica. Las dimensiones varían según la aplicación, pero la altura debe ser inferior a 1.5 m y el ancho debe ser inferior a 0.1 m. Además, el panel no debe contar con profundidades mayores a 0.07 m para mantener una buena distribución de luz en todo el cultivo y una densidad celular óptima. Se pueden clasificar como impulsados por bomba y por aire. Entre otras características se puede mencionar que constan de una alta relación área superficial/volumen y con un sistema de desacoplamiento de

gas abierto. Asimismo, el ángulo de inclinación y la distancia entre paneles es importante para lograr buenos rendimientos de biomasa (Alami *et al.*, 2020).

Las principales ventajas de este fotobiorreactor es que son relativamente baratos, son viables para cultivos al aire libre, cuentan con una gran superficie de iluminación, el recorrido de la luz es corto, la densidad celular es óptima, por lo tanto no se acumula oxígeno, se obtienen altas tasas fotosintéticas y altas tasas de producción de biomasa. Además, permiten la inmovilización de las algas y son fáciles de limpiar (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020). Sin embargo, entre las desventajas de este biorreactor se encuentra que es complicado controlar la temperatura del cultivo, es difícil escalar el sistema, puesto que aumenta la presión hidrostática y el sistema no lo puede soportar. Además, las microalgas pueden sufrir de estrés hidrodinámico, dependiendo su especie, y pueden crecer en la pared, impidiendo la correcta distribución de luz (Alami *et al.*, 2020).



Figura 9. Ejemplo de fotobiorreactor de panel plano.

(Alami *et al.*, 2020).

Fotobiorreactores de columna: Estos fotobiorreactores están hechos en forma de columna vertical y con materiales como vidrio transparente o acrílico (ver Figura 9). Tienen una estructura rígida y los diámetros varían entre los 15 y 20 cm. Por lo general, cuentan con un sistema de burbujeo de gas en la parte inferior, el cual permite convertir el gas de entrada en pequeñas burbujas que se elevan. Además, estas burbujas crean turbulencia para mezclar adecuadamente el medio de cultivo y lograr la transferencia de masa de dióxido de carbono y oxígeno producido. Asimismo, las fuentes de luz pueden ser instaladas internamente para proveer una mejor distribución de luz (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020).

Las ventajas de utilizar este biorreactor son que las burbujas ejercen poco esfuerzo cortante, por lo que hay poco daño celular, la mezcla obtenida es eficiente, lo que permite tener una alta transferencia de masa y una baja fotoinhibición y fotooxidación. Asimismo, las condiciones de cultivo son altamente controlables y se obtienen altos rendimientos de biomasa. Cabe agregar que las columnas son compactas, fáciles de mantener y limpiar, de bajo costo energético y cuentan con una alta escalabilidad. Esto último se puede lograr al multiplicar los biorreactores de columna (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020). Sin embargo, entre las desventajas de este biorreactor se puede mencionar que cuentan con una baja superficie de irradiación y pueden ser costosos por el tipo de material con el que se construyen. En el caso de las columnas muy altas, se pueden generar gradientes de dióxido de carbono, lo cual provoca gradientes de pH y la escases de este recurso. Asimismo, el tiempo de residencia del oxígeno puede aumentar y causar la inhibición del crecimiento celular. En el caso de columnas con diámetros mayores a los 20 cm provocan que se forme una zona de oscuridad en el medio de la columna, si esta no cuenta con iluminación interna, por lo que el crecimiento celular puede verse afectado y disminuir la producción de biomasa (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020).



Figura 10. Ejemplo de fotobiorreactor de columna.

(Alami *et al.*, 2020).

E. COSECHA DE BIOMASA

Una vez el cultivo de microalgas ha llegado a la fase estacionaria, se puede esperar un par de días más en esta fase para que las microalgas sintetizen más TAG's y así recuperar una mayor cantidad de estos lípidos. Debe procurarse de no llegar a la fase de muerte celular para evitar que estos lípidos se degraden (Scott, 2010). Por ende, una vez se desee detener el cultivo de microalgas, se debe proceder a la recuperación de los productos de interés, que en este caso son los lípidos. Para eso, primero se debe recuperar la biomasa producida en los reactores. Luego, se debe secar la biomasa para separarla por completo de los residuos del medio de cultivo. Posteriormente, se puede realizar el tratamiento de lisis celular a la biomasa seca para que las células liberen su contenido y, por último, se puede recuperar los lípidos con solventes (Chua & Schenk, 2017).

Uno de los métodos más utilizados para recuperar la biomasa del medio de cultivo es la centrifugación. Este método puede definirse como un método físico de deshidratación, el cual depende de la generación de una fuerza centrífuga, la cual actúa radialmente y acelera el movimiento y separación de las partículas en función de una diferencia de densidades entre dichas partículas y el medio en el que se encuentran. La fuerza centrífuga hace que las partículas más densas se desplacen hacia el exterior y las partículas menos densas hacia el interior. Con este método se puede concentrar la biomasa en el fondo y el medio de cultivo como sobrenadante, con una alta eficiencia, en poco tiempo y sin necesidad de añadir químicos. Sin embargo, cabe resaltar que este proceso puede requerir mucha energía y, por otro lado, debe realizarse adecuadamente para no inducir la lisis celular de las microalgas debido a la fuerza centrífuga y a las colisiones que las células pueden tener en el proceso. Es por esto que se recomienda utilizar pocas revoluciones por minutos en la centrifugación y en menos tiempo para prevenir la lisis celular (Najjar & Abu-Shamleh, 2020).

El secado simplemente consiste en remover el agua de la biomasa, lo cual es necesario, ya sea para su almacenaje, o para utilizarla en los demás procesos para recuperar los productos de interés como los lípidos. En general, la biomasa húmeda contiene hasta más del 80% de humedad. Por eso, se requiere de energía para evaporar el agua de la biomasa, lo cual puede llegar a ser costoso. Además, se debe procurar que la muestra de biomasa húmeda sea colocada de tal manera que no se formen capas gruesas donde el calor ya no pueda penetrar. Uno de los métodos más convencionales para lograr el secado es el secado al sol. Sin embargo, conforme la biomasa contiene más humedad, el proceso resulta poco eficiente, pues se requiere más tiempo para lograr el secado. Por lo tanto, resulta conveniente utilizar técnicas artificiales de secado como un tambor

rotatorio, flujo cruzado de secado, secado en bandejas, secado al vacío, horno, entre otros. El secado utilizando horno resulta simple y eficiente. El proceso se puede utilizar variando las temperaturas a las que se realizará el secado y el tiempo del proceso, siempre cuidando de no utilizar temperaturas elevadas para evitar la oxidación de los lípidos que se desean recuperar (Mallick, Bagchi, Koley & Singh, 2016).

F. MÉTODOS DE LISIS CELULAR

Para poder aprovechar los lípidos producidos en el interior celular de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, primero se requiere de un pretratamiento celular, en donde se induzca la lisis celular para que las células liberen su contenido en el medio, el cual será recuperado posteriormente para su aprovechamiento. Los métodos de lisis celular son diversos y pueden clasificarse en: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos.

Entre los métodos físicos se encuentran los siguientes:

Estrés mecánico: Uno de los métodos más utilizados en la industria para lograr la lisis celular de los microorganismos y que estos liberen su contenido intracelular es el estrés mecánico. Esto se debe a que se mantiene una alta efectividad de lisis celular y se consume poca energía. Una forma de lograr dicho estrés es utilizando una licuadora o cualquier equipo que permita lograr un cizallamiento sólido. Al utilizar dichos equipos, la lisis celular se logra gracias al contacto físico de las cuchillas afiladas, que giran a alta velocidad, contra las células de los microorganismos. Además, se logra una ruptura celular extra, gracias a que el mezclado a alta velocidad da lugar a que las células colisionen unas con otras y contra las paredes del recipiente en el que se da a cabo dicho procedimiento (McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013). Se considera que este método es rápido, altamente eficiente, de bajo costo operacional y altamente escalable (Lee, Cho, Chang & Oh, 2017).

Ultrasonido: Al utilizar ultrasonido para la lisis celular de las microalgas en el medio de cultivo, se da lugar a la formación de burbujas pequeñas de cavitación en el líquido donde se está dando el proceso y que rodea a las células. Estas burbujas, al explotar, transmiten la energía cinética a las células. Esto induce a la lisis celular, debido a que se genera una elevada tensión de cizallamiento en las paredes celulares. Además, se da un aumento repentino de la temperatura de forma localizada, lo cual también contribuye en cierta manera a la ruptura de la pared celular de los microorganismos. Cabe resaltar que el continuo movimiento del líquido también favorece a que

las células colisionen entre sí y expulsen su contenido (McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013). Este método se considera simple, altamente reproducible y eficiente (Lee, Cho, Chang & Oh, 2017).

Termólisis: El tratamiento térmico provoca que las células de las microalgas se desintegren mediante el calor o el frío, ya sea por altas temperaturas ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), temperaturas medias ($50\text{ }^{\circ}\text{C} - 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) o temperaturas de congelación ($< 0^{\circ}\text{C}$). En el caso del método por congelación, se realizan diversos ciclos de congelación-descongelación, consiguiendo la disrupción celular debido a la formación de cristales de hielo y a la expansión celular debido al descongelamiento. Por el otro lado, también se puede llevar a cabo una liofilización, en donde se aplica una presión de 1 kPa y temperaturas menores a los 40°C , a las microalgas previamente congeladas. En este caso, las paredes celulares se vuelven porosas debido a la formación de cristales de hielo, los cuales se subliman en la liofilización. Por último, al aplicar temperaturas medias o altas, se puede conseguir uno de los métodos de lisis celular más eficaces. En este método el calor ayuda a romper los enlaces de hidrógeno de la pared celular, provocando así cambios estructurales en esta. Asimismo, los carbohidratos y proteínas que conforman la pared celular se despolimerizan en monómeros, provocan así la lisis celular (D'Hondt *et al.*, 2017). En general, estos métodos pueden ser altamente rentables, además que no utilizan ningún químico (Lee, Cho, Chang & Oh, 2017).

Entre los métodos químicos se encuentran los siguientes:

Shock osmótico: La presión osmótica puede alterar o romper la pared celular de las microalgas mediante un aumento o disminución de la concentración de sales en el medio acuoso. Es decir, se cambia el equilibrio de la presión osmótica entre el interior y el exterior celular. Por lo general se logra agregando sales al medio. Cuando la concentración de sales es mayor en el exterior que en el interior celular, las células sufren de estrés hiper-osmótico. En este caso, las células se contraen, dañando así la pared celular, mientras los fluidos del interior celular se difunden hacia el exterior. Por el otro lado, cuando la concentración de sales es menor en el exterior, los fluidos se difunden al interior celular para balancear la presión osmótica, provocando que las células se expandan o revienten cuando el estrés hipo-osmótico es muy alto. Cabe resaltar que es el método hipo-osmótico el que se utiliza comúnmente para liberar el contenido intracelular de las microalgas (Ranjith, Hanumantha & Arumugam, 2015). Este método se considera como un método simple, eficiente, ecológico y rentable a comparación de otros métodos de lisis celular (Lee, Cho, Chang & Oh, 2017).

Hidrólisis química: Para lograr la lisis celular de las microalgas a través de la hidrólisis química, se pueden utilizar diversos ácidos como el ácido clorhídrico, ácido fosfórico y ácido

sulfúrico. Al agregar cualquiera de estos ácidos al medio donde se encuentran las microalgas, se dará lugar al cambio del pH. Este disminuirá de tal manera que provocará cambios en la estructura de la pared celular de las microalgas. Estos cambios se deberán a que los polisacáridos que componen la pared celular se pueden llegar a degradar por la alta oxidación debido al cambio del pH. Además, los enlaces entre los polisacáridos se verán debilitados y la pared celular se expandirá. Cabe resaltar que las proteínas presentes en la pared celular también se desnaturalizarán y esto afectará aún más a la estructura de la pared. En conjunto, esto hará que la pared celular se debilite y se rompa, permitiendo de esta manera que las células puedan liberar su contenido (Phyo, Gu & Hong, 2019). Este método es eficiente y relativamente barato a comparación de otros químicos utilizados, pero requiere de altos cuidados operacionales, como equipo de protección, materiales resistentes y tratamiento de aguas adecuado (Lee, Cho, Chang & Oh, 2017).

Entre los métodos biológicos se encuentra el siguiente:

Hidrólisis enzimática: La utilización de enzimas como método previo para la extracción de lípidos es utilizada por diversos autores, gracias a que permite extraer fácilmente estas biomoléculas. Cabe resaltar que las enzimas a utilizar dependerán de la composición de la pared celular de los microorganismos oleosos. Entre las enzimas más utilizadas están las celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas, entre otras. Este método es favorable gracias a la especificidad para desintegrar la pared celular de las microalgas, la temperatura de funcionamiento, el corto tiempo y su bajo requerimiento energético (Patel, Mikes & Matsakas, 2018). Sin embargo, la desventaja de este método radica en que la actividad enzimática puede verse afectada por la concentración de sustrato, el pH, la temperatura, la composición de los aceites, entre otros (Salazar, 2012).

G. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Una vez terminado el tratamiento para inducir la lisis celular en las microalgas, se requiere extraer los lípidos del medio para su posterior purificación y aprovechamiento, ya sea con la biomasa seca o húmeda. El método utilizado para lograrlo es la extracción con solventes, también conocido como extracción líquido-líquido. Este consiste en la separación de la sustancia de interés mediante la adición de un disolvente a la solución. El disolvente debe ser inmiscible o parcialmente inmiscible en la solución donde se encuentra la sustancia de interés, pero dicha sustancia debe ser lo más miscible posible en el disolvente agregado, con el fin de lograr su separación del medio original. En este caso, los lípidos deben ser miscibles en los solventes agregados al medio, pero

dichos solventes deben ser inmiscibles en el medio para lograr separar los lípidos de los otros componentes celulares y del medio donde se encuentra (Treybal, 1981).

Otra de las características con las que los solventes a utilizar deben contar es tener una alta volatilidad, con el fin de requerir poca energía en la destilación simple para poder evaporarse fácil y rápido para recuperar los lípidos de interés (Zhang *et al.*, 2019). La destilación simple consiste en transferir energía al sistema para que los solventes volátiles se evaporen y se cree así dos fases: una líquida donde se encuentran los lípidos y una gaseosa donde se encuentran los solventes utilizados. Posteriormente, los gases son condensados para recuperarlos en una nueva fase líquida, la cual puede reutilizarse. De esta forma se logra la recuperación de los lípidos (Treybal, 1981).

La hidrofobicidad de los solventes puede caracterizarse por el valor del Logaritmo de P, el cual es el coeficiente de partición de cierto solvente en una mezcla de octanol y agua. Los solventes que cuentan con un valor de $\text{Log } P \leq 0$ se consideran solventes relativamente hidrofílicos, en cambio, los que cuentan con un valor de $\text{Log } P > 0$ se consideran como solvente hidrofóbicos (ver Figura 9) (Zhang *et al.*, 2019).

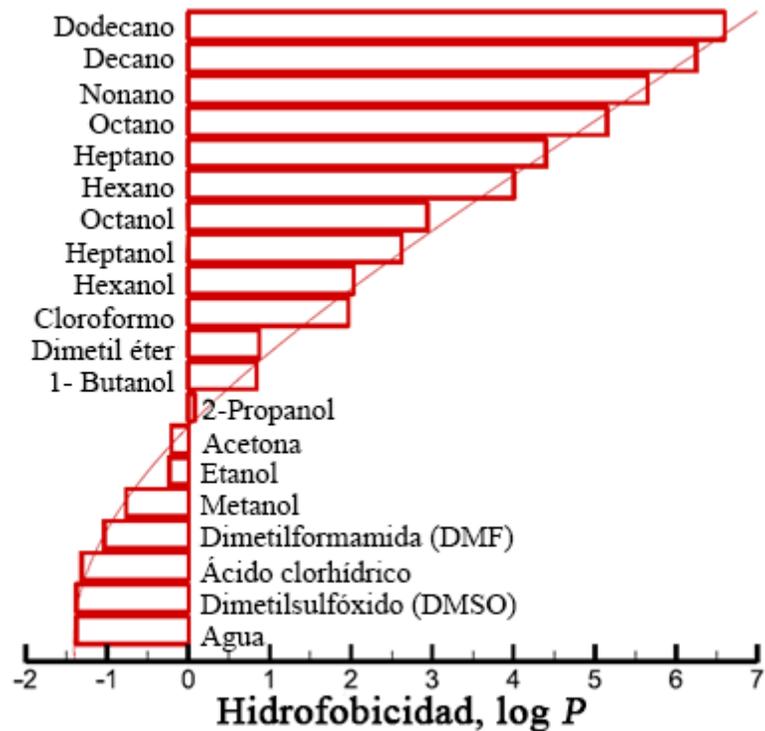


Figura 11. Coeficientes de partición en una mezcla de octanol/agua para distintos solventes. (Zhang *et al.*, 2019).

Cabe resaltar que, una vez que las microalgas han sufrido de lisis celular, se espera que la membrana plasmática de sus células esté expuesta al medio completa o parcialmente rota, de forma que los solventes agregados puedan actuar directamente sobre ellas. Estos solventes pueden actuar de distinta forma sobre la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática, dependiendo del valor del Log P con el que se caracterizan los solventes. Los solventes que son relativamente hidrofílicos interactúan fuertemente con los grupos funcionales que conforman la cabeza de los fosfolípidos (ver Figura 10a). En cambio, los solventes hidrofóbicos se acumulan dentro de la membrana plasmática (ver Figura 10b). La interacción de ambos tipos de solventes con la membrana plasmática puede provocar la formación de canales de poros o fases interdigitadas. Estas estructuras afectan las propiedades de barrera de las membranas y puede provocar su ruptura, en caso no haya sido lograda totalmente con la lisis celular. Por el otro lado, gracias a la afinidad de los solventes con los lípidos hidrofóbicos, los lípidos liberados al medio, luego de la lisis celular, migrarán a dicha fase y su recuperación será más fácil. Si los lípidos no han sido liberados, de igual forma los solventes podrán ingresar al interior celular y favorecerán la migración de los lípidos a la fase con el solvente (Zhang *et al.*, 2019).

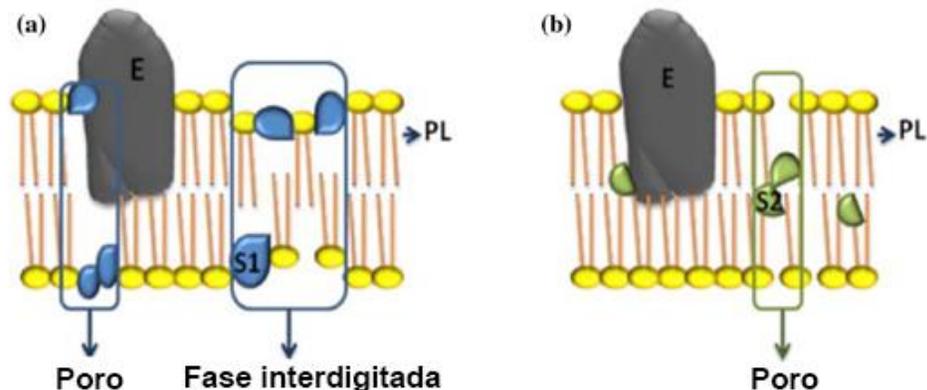


Figura 12. Estructuras de la membrana plasmática de *Nannochloropsis sp.* en presencia de solventes hidrofílicos (a) e hidrofóbicos (b).

(Zhang *et al.*, 2019).

Uno de los métodos más utilizados para la extracción de lípidos es el Método de Bligh & Dyer. Este consiste en utilizar una relación 2:1 de cloroformo:metanol, la cual permite la formación de una mezcla bifásica. El metanol, el cual es polar, permite romper los enlaces de hidrógeno entre los lípidos y las proteínas, tras añadir cloroformo como el disolvente orgánico apolar. Los lípidos quedan en la fase del cloroformo y los demás compuestos en la fase del metanol (Wong *et al.*, 2019). Cabe resaltar que la principal desventaja de este método es que dichos solventes no suelen ser amigables con el medio ambiente, por lo que se sugiere utilizar otros métodos con solventes

menos contaminantes (Wong *et al.*, 2019). A pesar de esto, existen distintas modificaciones a este método, con el fin de lograr que la extracción de lípidos sea más eficiente y se utilice menos de estos solventes que no favorecen al medio ambiente. Entre dichas modificaciones al método se encuentra la mezcla de solventes cloroformo:metanol:agua en una proporción 5.7:3:1. Se ha reportado que la adición de agua favorece a la formación de fases para la extracción eficiente de lípidos de los demás productos celulares (Chatsungnoen & Chisti, 2016).

Otro de los métodos de extracción de lípidos con solventes es utilizar n-hexano, pues actúa como disolvente de las grasas, es barato y puede reutilizarse. Este solvente se puede utilizar en combinación de otros como etanol y diclorometano, con el fin de formar mezclas bifásicas y mejorar la extracción de lípidos (Zhang *et al.*, 2019). Cabe resaltar que además de la combinación de hexano:etanol, se ha reportado el uso de hexano:isopropanol como solventes verdes para ser una alternativa al cloroformo:metanol. El uso de estos solventes verdes o amigables con el medio ambiente han tomado cada vez más importancia en la investigación para la extracción de lípidos, puesto que generan un menor impacto ambiental a la vez que generan buenos rendimientos en la extracción de lípidos (De Jesús & Filho, 2020).

H. MÉTODO DE FLUORESCENCIA PARA EL CONTEO CELULAR DE MICROALGAS

Para cuantificar la cantidad de células presentes en el cultivo de microalgas se puede utilizar el método de fluorescencia del equipo MUSE[®]. El MUSE[®] es un analizador de células que utiliza una tecnología de detección fluorescente miniaturizada y la tecnología microcapilar para analizar cuantitativamente las células en suspensión y las células adherentes que tienen un tamaño de 2 a 60 μm de diámetro. Esta tecnología permite obtener análisis con altos rendimientos y evalúa hasta 3 parámetros celulares: tamaño celular y la presencia de 2 colores, rojo y amarillo. Para lograr el análisis solo se debe ingresar al equipo una muestra de 1 mL del medio de cultivo. Esta entrará en contacto con el capilar y un láser verde se emitirá en el capilar para cuantificar las células presentes en la muestra. Con el láser se podrá detectar a las células por su color verde característico y su tamaño. Además, el equipo podrá cuantificar las células totales, las células viables y el porcentaje de viabilidad. Incluso es capaz de reportar la presencia de desechos celulares (Millipore Sigma, 2016).

I. MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NITRATOS

Para cuantificar los nitratos presentes en una muestra es posible utilizar el método colorimétrico del equipo HACH DR 890. El fundamento de este método es utilizar el cadmio metálico para reducir los nitratos presentes en la muestra a nitritos. Los iones nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio, la cual se acopla al ácido gentísico para formar un producto de color ámbar. La intensidad de este color es directamente proporcional a la concentración de nitratos en la muestra. Por ende, una vez la muestra, de 10 mL máximo, ha reaccionado con todos los reactivos y se ha tornado del color ámbar, se puede analizar con un colorímetro para determinar la concentración de nitratos en la muestra (HACH, 2009).

J. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

La espectroscopía infrarroja es un tipo de espectroscopía de absorción que cuantifica la luz que es absorbida por un compuesto en función de la longitud de onda de la luz. En este caso cuantifica la interacción entre la radiación infrarroja y el compuesto de interés. Esta metodología se utiliza ampliamente para la identificación de sustancias químicas o grupos funcionales, sin dañar a la muestra en análisis. Por ejemplo, se puede utilizar para identificar la presencia de triacilglicerol en una muestra. Su funcionamiento se basa en que un espectrofotómetro produce el espectro infrarrojo, lo irradia hacia la muestra y mide la cantidad de luz que es transmitida en función de la longitud de onda, para luego graficar dichos resultados que se conocen como el espectro infrarrojo. Cabe resaltar que los espectrofotómetros infrarrojos operan en la región infrarroja del espectro, justo debajo de las frecuencias de luz visible y por encima de las frecuencias más altas de microondas. Las longitudes de onda a la que operan van desde 2.5×10^{-4} cm hasta 25×10^{-4} cm (Wade, 2017).

Cabe resaltar que casi todas las moléculas son capaces de absorber la radiación infrarroja, a excepción de las moléculas diatómicas como el O_2 y H_2 . Por lo tanto, el espectro infrarrojo de sustancias químicas que cuentan con diversos tipos de átomos es muy complejo debido a la gran variedad de vibraciones posibles que se pueden generar al absorber el haz de luz infrarrojo. A pesar de esto, las bandas de absorción que se registran en el espectro infrarrojo son características para ciertos grupos funcionales, por lo que se puede decir que cada sustancia química cuenta con una huella dactilar que facilita su identificación (Wade, 2017).

En general, el espectro infrarrojo se divide en dos partes. La primera se conoce como la huella dactilar del compuesto, que va desde los 600 a 1400 cm^{-1} (número de onda) y la segunda parte va desde los 1400 a 4000 cm^{-1} . En la región de la huella dactilar se registran todas las vibraciones complejas que son características de cada compuesto. En la segunda región los picos del espectro infrarrojo provienen de las vibraciones de los enlaces presentes en los grupos funcionales. En la Figura 13 se resumen las frecuencias de estiramiento (picos de absorbanza) de los grupos funcionales más relevantes. Este resumen permite analizar e interpretar de forma fácil el espectro infrarrojo de cualquier compuesto (Wade, 2017).

Cabe agregar que los grupos carbonilo que están presentes en los ésteres presentan en el espectro infrarrojo un pico de absorbanza muy intenso alrededor de los 1735 cm^{-1} . Los enlaces carbono-hidrógeno y carbono-carbono, comunes en las cadenas saturadas de los ácidos grasos, presentan una absorbanza a 2800-3000 cm^{-1} y alrededor de los 1200 cm^{-1} , respectivamente. Por otro lado, los ésteres muestran un estiramiento del enlace carbono-oxígeno entre 1000 y 1200 cm^{-1} (Wade, 2017).

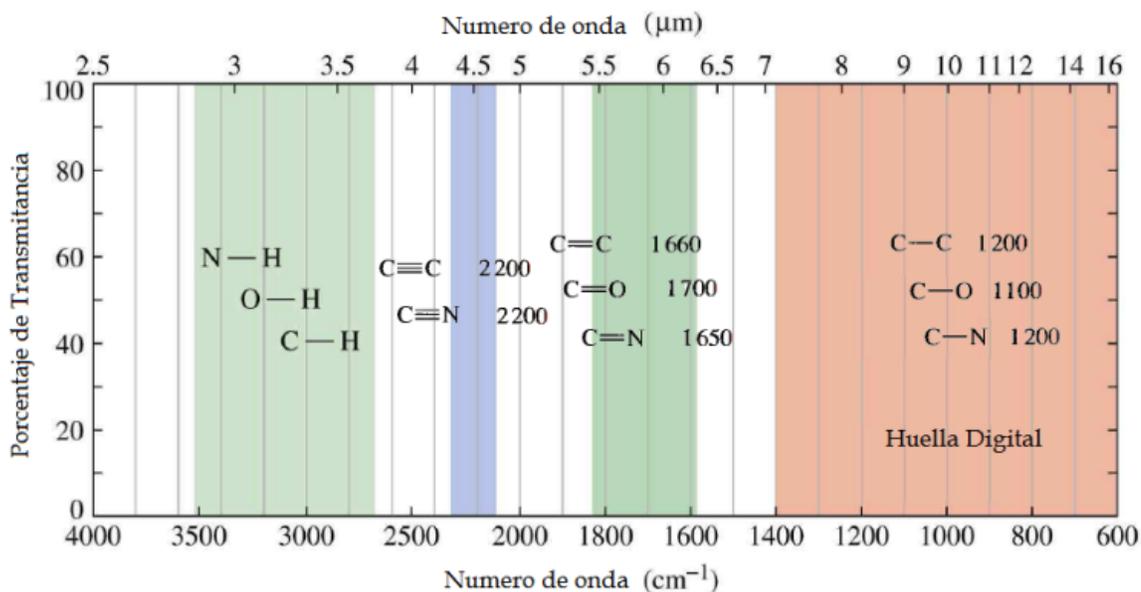


Figura 13. Resumen de las frecuencias de estiramiento IR

(Wade, 2017).

K. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento de las microalgas dentro de los fotobiorreactores tendrá un comportamiento característico, el cual puede ser predecible y cuantificable. Al conocer la concentración celular con el tiempo se puede realizar una curva del crecimiento celular y esta puede contar con 6 etapas características.

La primera es la fase de adaptación (ver Figura 12.A). En esta, las microalgas se adaptan al medio, sintetizan enzimas y ácidos nucleicos necesarios para el crecimiento y las células aumentan su tamaño y se preparan para reproducirse. El crecimiento se ve como un período casi plano en la gráfica, puesto que el cambio de la concentración celular es cero. El tiempo que tarde en culminar esta fase va a depender de la concentración del inóculo, la edad de las células en dicho inóculo, la composición del cultivo y las condiciones ambientales a las que se está sometiendo el cultivo (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009). La segunda fase es la aceleración (ver Figura 12.B). En esta, la concentración celular comienza a incrementar y la tasa de división celular incrementa hasta alcanzar un punto máximo. El crecimiento celular se ve como un incremento pequeño en la curva (Lee, 2009).

La tercera fase es la exponencial (ver Figura 12.C). En esta, la concentración celular incrementa exponencialmente conforme las células comienzan a dividirse. La tasa de crecimiento incrementa en esta fase, sin embargo, la tasa de división celular se mantiene constante en un valor máximo. Además, se sintetizan aminoácidos y nucleótidos necesarios para la etapa. El crecimiento se observa como una recta exponencial en la gráfica (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009). La cuarta fase es la desaceleración (ver Figura 12.D). Esta se da después que la tasa de crecimiento alcanza el máximo, puesto que le sigue una desaceleración de la tasa de crecimiento y de la tasa de división celular. El crecimiento se observa como una curva que tiende a un comportamiento constante (Lee, 2009).

La quinta fase es la estacionaria (ver Figura 12.E), donde la cantidad de células que se reproduce se iguala a la cantidad de células que mueren, por lo que la cantidad de células alcanzará un valor máximo. Esto se debe a que los nutrientes se comienzan a agotar y por la presencia de productos tóxicos derivados del metabolismo celular, lo cual limitará el crecimiento celular. El crecimiento nuevamente se observa como un período plano en la gráfica (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009). La sexta y última fase es la de muerte celular (ver Figura 12.F). En esta, los nutrientes limitantes se agotan y las células comienzan a morir en mayor proporción, por lo que la

cantidad de células viables disminuye exponencialmente. Esto se observa como un declive en la gráfica (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009).

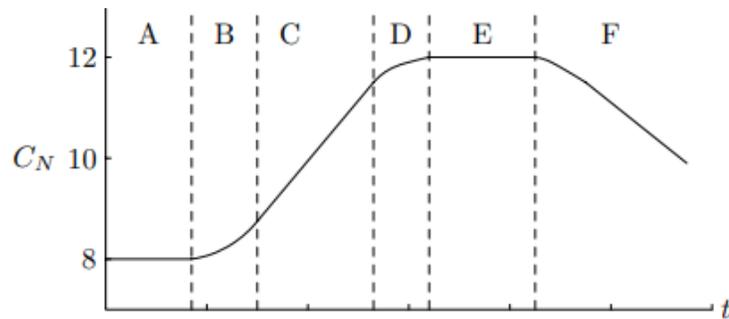


Figura 14. Representación de la curva de crecimiento de microorganismos como las microalgas.

A: fase de adaptación; B: fase de aceleración; C: fase de crecimiento exponencial; D: fase de desaceleración; E: fase estacionaria; F: fase de muerte.

(Lee, 2009).

Por otro lado, cada curva de crecimiento cuenta con constantes que son indispensables para definirla. Las principales son la velocidad de crecimiento (r_N), la velocidad de crecimiento específica (μ), la tasa de división celular (δ). La velocidad de crecimiento indica cómo cambia la concentración celular en el tiempo, la velocidad de crecimiento específica indica la cantidad de células que se pueden reproducir a partir de una célula en una unidad de tiempo. En cambio, la tasa de división celular indica el tiempo que le toma a una célula producirse. Estas constantes permiten analizar la capacidad de los microorganismos para reproducirse y la velocidad a la que lo hacen. Además, permiten diferenciar entre especies de microorganismos, puesto que cada uno cuenta con un valor diferente por constante (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009).

La velocidad de crecimiento puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$r_N = \frac{C_N}{dt} = \mu C_N$$

Ecuación 1. Velocidad de crecimiento celular.

(Lee, 2009).

En donde C_N es la concentración celular expresada como número de células en una unidad de volumen, μ la velocidad de crecimiento específica expresada en unidades de $[\text{tiempo}]^{-1}$ y dt el cambio en el tiempo (Lee, 2009).

La velocidad de crecimiento específica puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{C_N} \frac{dC_N}{dt} = \frac{d \ln C_N}{dt}$$

Ecuación 2. Velocidad de crecimiento celular específica.

(Lee, 2009).

La tasa de división celular puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{d \log_2 C_N}{dt}$$

Ecuación 3. Tasa de división celular.

(Lee, 2009).

Por lo tanto, la velocidad de crecimiento específica también puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{d \ln C_N}{dt} = \ln 2 \left(\frac{d \log_2 C_N}{dt} \right) = \delta \ln 2$$

Ecuación 4. Velocidad de crecimiento celular específica expresada con la tasa de división celular.

(Lee, 2009).

L. MODELOS CINÉTICOS MATEMÁTICOS

Modelo de Monod: Este modelo se utiliza ampliamente para expresar el efecto que tiene la concentración del sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento específica (μ). Se caracteriza por expresar cómo la velocidad de crecimiento específico aumenta con la concentración del sustrato limitante. Su expresión empírica está basada en la forma de ecuación que normalmente se asocia a la cinética enzimática. El modelo de Monod se expresa con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S}$$

Ecuación 5. Modelo de Monod: velocidad de crecimiento celular específica

(Lee, 2009).

En donde μ_{\max} es la velocidad máxima específica de crecimiento, C_S es la concentración del sustrato limitante en el medio de cultivo y K_S es un parámetro constante que expresa la afinidad al sustrato limitante. El valor de K_S es igual a la concentración del sustrato limitante cuando la velocidad específica de crecimiento cuenta con un valor igual a la mitad de su máximo valor (Lee, 2009).

Cabe resaltar que el modelo de Monod es una simplificación del complicado mecanismo del crecimiento celular como resultado de todas las reacciones bioquímicas que conforman el metabolismo celular. Por ende, describe adecuadamente la cinética de las fermentaciones microbianas cuando las concentraciones de los inhibidores en el medio son bajas. Además, de acuerdo con la expresión del modelo, un incremento en la concentración del sustrato una vez que μ alcanza el valor de μ_{\max} no afectará la velocidad de crecimiento específica, por lo que el valor de esta variable tenderá a ser constante (ver Figura 15) (Lee, 2009).

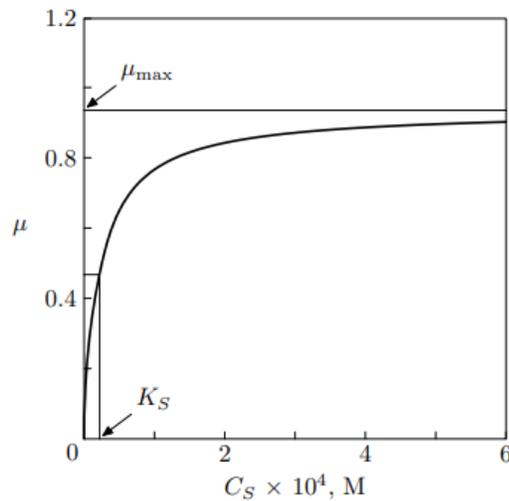


Figura 15. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento en la concentración del sustrato limitante.

(Lee, 2009).

Modelo de Contoi: Este modelo es una variación del modelo de Monod. Se caracteriza por considerar cómo la concentración de células en el medio afecta directamente al crecimiento celular. Además, se utiliza ampliamente en sistemas donde la concentración celular es alta y se da la producción de metabolitos o inhibidores que resultan tóxicos para la célula. El modelo de Contoi se expresa como la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S X + C_S}$$

Ecuación 6. Modelo de Contoi: velocidad de crecimiento celular específica.

(Lee, 2009).

En donde X es la concentración celular y las demás variables son las mismas que se describen en el modelo de Monod (Lee, 2009).

Modelo de Moser: Este modelo es una mejora al modelo de Monod. Se caracteriza por incluir el parámetro n, donde $n > 1$, para representar los datos experimentales con un mejor ajuste. Se utiliza como una buena aproximación cuando la composición celular es independiente del tiempo, cuando el crecimiento celular es balanceado o cuando la composición celular no es relevante a escala industrial. El modelo de Moser se expresa como la siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{S^n}{K_S + S^n}$$

Ecuación 7. Modelo de Moser: velocidad de crecimiento celular específica.

(Lee, 2009).

En donde las variables son las mismas que se describen en el modelo de Monod (Lee, 2009).

V. ANTECEDENTES

Estudios recopilados en Hu, 2004, indican que la síntesis y acumulación de lípidos se maximiza en medios de cultivos con bajas concentraciones de nitrógeno. Además, indican que los lípidos neutros, es decir, los triacilgliceroles (TAGs) predominan en el citoplasma de las células. En el estudio de Rodolfi y colaboradores, 2009, se logró que las microalgas *Nannochloropsis sp.* alcanzaran un 60% de contenido de lípidos bajo condiciones de baja concentración de nitrógeno (1.25%) y fósforo, combinado con altas intensidades de luz. Al compararlo con el 22.7% y 29.7% de lípidos que normalmente se encuentra en las células, evidentemente en el estudio se logró que la síntesis de lípidos aumentara (Hu, 2004; Tamburic *et al.*, 2014). Por el otro lado, en el estudio de Wei & Huang, 2017, se cultivó la microalga *N. oculata* en condiciones deficientes de nitrógeno. Este nutriente se encontraba a una concentración de 12.32 mg N/mL. El resultado obtenido fue que los TAGs aumentaron de 8.85% a un 78.16% respecto al peso seco de la microalga. En el estudio de Rodolfi y colaboradores, 2009, se logró que las microalgas *Nannochloropsis sp.* aumentarían en un 50% su contenido de ácidos grasos bajo condiciones de altas intensidades de luz y escasez de nitrógeno y fósforo (menos del 1%).

Asimismo, diversos estudios sugieren que el contenido de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados, entre los cuales se encuentra el ácido eicosapentaenoico (EPA), está inversamente relacionado con la intensidad lumínica utilizada para optimizar el crecimiento (Hu, 2004). En la revisión bibliográfica de Hu, 2004, se expone que un estudio encontró que las células de *Nannochloropsis* presentan un alto contenido de lípidos y de EPA conforme se alcanzan las condiciones de saturación de luz a un nivel de radiación de 290 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Por el otro lado, en el estudio de Pal y colaboradores, 2011, se evaluó el efecto del nitrógeno, intensidad de luz y salinidad sobre la producción de lípidos en las microalgas *N. oculata*. Se encontró que en el medio de cultivo con suficiente nitrógeno, el efecto del aumento de la intensidad de luz y de la salinidad fue un aumento en el peso seco de las microalgas y en la cantidad de lípidos, gracias a una mejor formación de TAGs, los cuales representaron el 25% de la biomasa. Cabe resaltar que el medio de cultivo tuvo por 7 días una intensidad de luz de 700 μmol de fotones $/\text{m}^2 \text{ s}$ y 40 g de cloruro de sodio/L.

En el estudio de Razzak y colaboradores, 2015, se analizó distintas proporciones de CO_2 y aire en un medio de cultivo de agua sintética en donde crecieron *N. oculata*. Cabe resaltar que las microalgas se cultivaron en condiciones mixotróficas y en un fotobiorreactor semi-batch. Se encontró que en una proporción del 8% de CO_2 permitió la mayor razón de crecimiento de las microalgas y la mayor productividad, la cual fue de 0.088 g de biomasa/Ld. Por otro lado, en el

estudio de Eloka & Inambao, 2017, se encontró que, en comparación con el CO₂ atmosférico, el cultivo de diversas especies de microalgas demostraron un mayor crecimiento con la adición de un 1% (v/v) de CO₂. Asimismo, se encontró que la tasa de crecimiento fue un 60% mayor en la fase logarítmica gracias a este enriquecimiento y se resaltó que el CO₂ impulsa la producción de biomasa y de lípidos en las microalgas.

En la tesis de Aguilera, Carolyn, aprobada en el año 2021, para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala, se implementó un reactor abierto tipo raceway de 20 L a escala laboratorio para el cultivo de microalgas para la producción de aceite. Con los resultados obtenidos se determinó que las condiciones de un ciclo de exposición solar mixto, una velocidad de aireación de 0.08 m/Ls y una salinidad del 2% (m/v), permiten alcanzar rendimientos de biomasa y de aceite respecto al consumo del sustrato limitante, el cual es nitrógeno en forma de nitratos, con valores de 2.78×10¹³ células/mol NaNO₃ y 1.40×10³ g aceite/mol NaNO₃, respectivamente. Además, se propuso un modelo cinético de Contoi que describe el crecimiento celular y el consumo del sustrato limitante en el sistema reactivo empleado a escala laboratorio. Dicho modelo toma en cuenta la influencia de la luz y la velocidad de aire en el medio. El modelo cinético propuesto fue el siguiente:

$$\mu = \left(\left(\frac{k_5 E}{k_4 CN_6 + k_5 E} \right) + L \right)^k * \left(\frac{\mu_{\max} CS}{K_s CN + CS} \right) * \left(\frac{a_3 A_4}{a_2 + a_3 A_4} \right)^i + N$$

Ecuación 8. Modelo cinético de Contoi propuesto por Aguilera, 2021.

En donde μ es la velocidad de crecimiento específica, μ_{\max} la velocidad máxima de crecimiento específica, CN la concentración celular, CS la concentración del sustrato limitante, K_s la constante de afinidad al sustrato, E la intensidad lumínica a la que fue expuesto el medio de cultivo, L el modificador empleado para representar la dificultad de la luz para atravesar el medio de cultivo, N el modificador empleado para representar los problemas asociados a la transferencia de masa, A₄ el flujo de aire al que fue expuesto el medio de cultivo, a₂ y a₃ son las constantes asociadas al efecto de la variación de la velocidad de aireación, k₄ y k₅ son las constantes asociadas al efecto de la variación de la intensidad lumínica y donde k e i son exponentes a los que se elevan los términos que indican el efecto de la intensidad lumínica y el flujo de aire, respectivamente.

En la tesis de Leong, Ka-jon, aprobada en el año 2021, para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Industrial de la Universidad del Valle de Guatemala, se implementó un fotorreactor tubular de 8 L con columna de burbujas en el Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Para dicho fotorreactor se construyó un

manual para estandarizar los pasos de arranque, instrucciones de operación, partes, recomendaciones y limpieza del equipo. Además, se estableció los tiempos de iluminación en función al rendimiento de producción de microorganismos para maximizar el crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en condiciones controladas. Se obtuvo que bajo las condiciones de una aireación constante de $1.18 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$ ($15.00 \text{ ft}^3/\text{h}$), temperatura constante de 20°C , concentración inicial x1 del medio f/2 guillard y un ciclo 8:16, es decir 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, se alcanzó la mayor producción de biomasa. Asimismo, se propuso un modelo cinético de Contoi que describe el crecimiento celular en función al consumo del sustrato limitante, dejando constante las condiciones de cultivo mencionadas y variando los ciclos de luz/oscuridad. El modelo cinético propuesto fue el siguiente:

$$\frac{dCn}{dt} = \left(\frac{\mu_{max} * (C_{S(t-n)} - C_{Sf})}{K_s * CN + (C_{S(t-n)} - C_{Sf})} \right) * \left(\frac{k_1 * E}{k_2 + k_1 * E} \right)$$

Ecuación 9. Modelo cinético de Contoi propuesto por Leong, 2021.

En donde $\frac{dCn}{dt}$ es la velocidad de crecimiento específica, μ_{max} la velocidad máxima de crecimiento específica, CN la concentración celular, $C_{S(t-n)}$ la concentración del sustrato limitante según el tiempo de fermentación, C_{Sf} la concentración final del sustrato limitante, K_s la constante de afinidad al sustrato, E la intensidad lumínica a la que fue expuesto el medio de cultivo, n el ajuste del modelo cinético de Monod, t el tiempo en días y donde k_1 y k_2 son las constantes asociadas a la intensidad lumínica.

En el estudio de Gharagozloo y colaboradores, 2014, se analizó y modeló el crecimiento de *Nannochloropsis salina* en laboratorio, invernadero y en reactores tipo raceway. Para el modelo del crecimiento celular se consideró la influencia de la disponibilidad de nutrientes en el medio, por lo que se utilizó el modelo de Monod, el cual se expresó como la siguiente ecuación:

$$f(\nu) = \frac{\nu}{K_X^h + \nu}$$

Ecuación 10. Modelo de Monod propuesto por Gharagozloo y colaboradores, 2014.

En donde $f(\nu)$ es la velocidad específica de crecimiento, ν es la concentración de nutrientes y K_X^h es la constante de afinidad al sustrato.

En dicho estudio se expone que el crecimiento de las microalgas analizadas se modeló bajo una concentración limitada de los siguiente nutrientes: amonio disuelto (NH_4), nitrato (NO_3), fosfato

(PO₄) y dióxido de carbono (CO₂). Por lo que la velocidad específica de crecimiento se modeló con la siguiente ecuación:

$$f(\nu) = \min\left(\frac{NH_4 + NO_3}{K_N^h + NH_4 + NO_3}, \frac{PO_4}{K_P^h + PO_4}, \frac{CO_2}{K_C^h + CO_2}\right)$$

Ecuación 11. Modelo de Monod final propuesto por Gharagozloo y colaboradores, 2014.

En donde K_N^h, K_P^h y K_C^h son las constantes de afinidad al NH₄ y NO₃, PO₄ y CO₂, respectivamente.

Cabe agregar que los resultados de dicho estudio revelan que dicho modelo predice el crecimiento de las microalgas analizadas en sistemas con una escala variable e identifica las causas que provocan una reducción en la productividad de biomasa. Además, se resalta que aplicar este modelo facilita la optimización del diseño de reactores del tipo de laguna abierta y mejora la selección de las cepas a utilizar en dichos reactores.

En el estudio de McMillan, Watson, Ali y Jaafar, publicado en el año 2012, se evaluaron distintos métodos a escala laboratorio para la lisis celular de las microalgas *Nannochloropsis oculata*. Los métodos evaluados fueron: tratamiento con láser, tratamiento con microondas, estrés mecánico por cizallamiento, termólisis y tratamiento con ultrasonido. Estos fueron aplicados, con sus respectivas condiciones, a distintas muestras del cultivo de microalgas a una concentración de 1.8 * 10⁸ células/mL. Para analizar la lisis celular se tomaron muestras de 30 µL y para cuantificarla se utilizó un microscopio de campo brillante Leitz Wetzlar. Se determinó que el mayor porcentaje de lisis celular se logró con el tratamiento láser, con un valor medio de 96.53 ± 0.92%. El segundo tratamiento con mayor porcentaje de lisis celular fue el tratamiento con microondas con un valor medio de 94.92 ± 1.38%, seguido del estrés mecánico por cizallamiento con un valor medio de 92.95 ± 0.97%, seguido de la termólisis con valor medio de 87.72 ± 1.82% y seguido de último por el ultrasonido con un valor medio de 67.66 ± 1.97%. Cabe resaltar que el estrés mecánico por cizallamiento se realizó utilizando una batidora de mano de 120W (modelo XB982, Asda, Reino Unido) a 3000 rpm por 6 minutos. Por el otro lado, el tratamiento con ultrasonido se realizó utilizando el equipo Langford Electronics Ltd., Reino Unido, de 40 W por 20 minutos.

Cabe mencionar nuevamente que en la tesis de Aguilera, Carolyn, 2021, se utilizó la hidrólisis química con ácido clorhídrico 0.5 M para realizar la lisis celular de las microalgas utilizadas en el estudio. La biomasa recolectada de las microalgas fue molida con un pistilo y luego tratada con ácido clorhídrico 0.5 M a una velocidad de 500 rpm por 1 hora. Cabe resaltar que la relación utilizada fue de 150 mL de HCl 0.5 M por cada 10 gramos de biomasa seca. El procedimiento

anterior fue aplicado a la biomasa obtenida bajo las condiciones de mayor rendimiento como se mencionan anteriormente. Luego, la recuperación del aceite producido por las microalgas se realizó utilizando la mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1) en una proporción de 20 gramos de solvente por cada gramo de biomasa hidrolizada. Con esto, se logró la recuperación de $1.40 \cdot 10^{-3}$ g de aceite por cada mol de nitrato de sodio.

En el estudio de Kumari & Kumar, 2019, utilizaron biomasa obtenida a partir de microalgas a la cual le extrajeron productos celulares y lípidos para producir biodiesel, mediante un método de Folch modificado. Utilizaron metanol, cloroformo y cloruro de sodio 1 M. En la fase del cloroformo recuperaron los lípidos, en la fase del metanol recuperaron ácido acético, ácido butírico, DMSO, glicerol, glucosa, fructosa, entre otros carbohidratos. Cabe resaltar que las fases obtenidas de la extracción líquido-líquido fueron analizadas en espectroscopía infrarroja (IR) para analizar los compuestos recuperados en cada una. Por otro lado, en el estudio de Cavonius, Carlsson & Undeland, 2014, se buscaba cuantificar los ácidos grasos totales en diferentes especies de microalgas, utilizando varios métodos de extracción de lípidos. Utilizando el método de Bligh & Dyer, en donde se emplea la mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1), se logró extraer 830 mg de ácidos grasos/gramo de biomasa de las microalgas *N. oculata* (83% p/p).

En el estudio de Chatsungnoen & Chisti, 2016, se buscaba optimizar la extracción de aceite de la biomasa de *Nannochloropsis sp.* Se utilizó 1 g de biomasa seca y 33 mL de la mezcla de solventes cloroformo:metanol:agua. Se encontró que la mezcla de estos solventes en una proporción 5.7:3:1 presenta mejoras significativas al método de Bligh & Dyer, ya que se logró extraer más del 96% (p/p) de aceite de la biomasa. En el estudio de Hanupurti & Kristiawan, 2014, se buscaba extraer aceites de la biomasa de *Nannochloropsis sp.*, para lo cual utilizaron la mezcla de solventes etanol:hexano (1:1). Se reporta que se logró extraer 63.59% (p/p) de aceites respecto al peso seco de la biomasa.

VI. METODOLOGÍA

1. Preparación del medio de cultivo Guillard f/2 modificado

Materiales y equipo:

- Estufa con agitación
- Balanza analítica Pioneer OHAUS
- Refrigeradora
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- 5 Erlenmeyer de 250 mL
- 4 Erlenmeyer de 2 L
- 1 Beaker de 5 L
- 5 agitadores magnéticos
- Biotina
- Tiamina HCl
- Sulfato de cobre
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Cloruro de cobalto hexahidratado
- Cloruro de manganeso tetrahidratado
- Nitrato de sodio
- Fosfato dipotásico
- Papel aluminio
- Filtro de 2 μm

Procedimiento:

Preparación del medio concentrado de cultivo Guillard f/2 modificado:

1. En un beaker de 5 L previamente esterilizado, agregar 43.35 mL de la solución de fosfato dipotásico preparada.
2. Agregar al mismo beaker del paso 1 45 mL de la solución de trazas de metal preparada.
3. Agregar 4888.2 mL de agua destilada al beaker del paso 1.
4. Agregar al mismo beaker del paso 1 un agitador magnético esterilizado y tapar el beaker con aluminio.
5. Trasladar el beaker a una estufa y establecer la agitación al nivel 8 por 5 minutos.

6. Trasladar el beaker al autoclave, configurar el sistema con el programa para autoclavar medios líquidos y cerrar la puerta.
7. Al término del proceso, utilizar guantes especiales para manipular el equipo y retirar el beaker con el medio.
8. Trasladar el beaker a la estufa del paso 5 y esperar que se tempere.
9. Agregar al medio del beaker 22.5 mL de la solución de vitaminas preda utilizando un filtro de 2 μm .
10. Agitar el medio en el nivel 8 por 5 minutos y al terminar trasladar el medio preparado a un envase de plástico previamente esterilizado con cloro al 10% y etanol al 70%.

Preparación de la solución de nitrato de sodio 0.25 M:

1. Pesar 21.2487 gramos de nitrato de sodio en la balanza analítica.
2. Trasladar la cantidad pesada a un Erlenmeyer de 2 L previamente esterilizado.
3. Agregar 1 L de agua destilada, medida con probeta de 1 L, al Erlenmeyer del paso anterior.
4. Agregar un agitador magnético esterilizado al medio y tapar el Erlenmeyer con aluminio.
5. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa y establecer la agitación al nivel 8.
6. Agitar la solución por 5 minutos y al terminar llevar a refrigeración.

Preparación de la solución de fosfato dipotásico:

1. Pesar 1.2500 gramos de fosfato dipotásico en la balanza analítica.
2. Trasladar la cantidad pesada a un Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado.
3. Agregar 250 mL de agua destilada, medida con probeta de 1 L, al Erlenmeyer del paso anterior.
4. Agregar un agitador magnético esterilizado al medio y tapar el Erlenmeyer con aluminio.
5. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa y establecer la agitación al nivel 8.
6. Agitar la solución por 5 minutos y al terminar llevar a refrigeración.

Preparación de la solución de trazas de metal:

1. Pesar 0.502 gramos de sulfato de cobre en la balanza analítica.
2. Trasladar la cantidad pesada a un Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado.
3. Agregar 80 mL de agua destilada, medida con probeta de 50 mL, al Erlenmeyer del paso anterior.
4. Agregar un agitador magnético esterilizado al medio y tapar el Erlenmeyer con aluminio.
5. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa y establecer la agitación al nivel 8.
6. Agitar la solución por 5 minutos y retirar el Erlenmeyer de la estufa.
7. Repetir el procedimiento del 1 al 6 con 1.76 gramos de sulfato de zinc heptahidratado, 0.8 gramos cloruro de cobalto hexahidratado y 14.4 gramos de cloruro de manganeso tetrahidratado.
8. Pesar 1.90 gramos de cloruro férrico en la balanza analítica.
9. Trasladar la cantidad pesada a un Erlenmeyer de 2 L previamente esterilizado.
10. Pesar 3.93 gramos de EDTA disódico en la balanza analítica.
11. Trasladar la cantidad pesada al Erlenmeyer de 2 L.
12. Trasladar con micropipeta 1 mL de cada una de las soluciones preparadas anteriormente: sulfato de cobre, sulfato de zinc heptahidratado, cloruro de cobalto hexahidratado y cloruro de manganeso tetrahidratado.
13. Aforar el Erlenmeyer de 2 L con 1 L de agua destilada.
14. Agregar un agitador magnético esterilizado al medio y tapar el Erlenmeyer con aluminio.
15. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa y establecer la agitación al nivel 8.
16. Agitar la solución por 5 minutos, retirar el Erlenmeyer de la estufa y refrigerar.

Preparación de la solución de vitaminas:

1. Pesar 1 gramo de biotina en la balanza analítica.
2. Trasladar la cantidad pesada a un Erlenmeyer de 2 L previamente esterilizado.

3. Agregar 1 L de agua destilada, medida con probeta de 1 L, al Erlenmeyer del paso anterior.
4. Agregar un agitador magnético esterilizado al medio y tapar Erlenmeyer con aluminio.
5. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa y establecer la agitación al nivel 8.
6. Agitar la solución por 5 minutos y retirar el Erlenmeyer de la estufa.
7. Pesar 0.200 gramos de Tiamina HCl y trasladarlos a un Erlenmeyer de 2 L previamente esterilizado.
8. Agregar con micropipeta 1 mL de la solución de biotina realizada anteriormente al Erlenmeyer del paso anterior.
9. Aforar el Erlenmeyer a 1 L con agua destilada.
10. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa y establecer la agitación al nivel 8.
11. Agitar por 5 minutos, retirar el Erlenmeyer de la estufa y refrigerar.

2. Preparación del inóculo inicial

Materiales y equipo:

- Cultivo de microalgas obtenido del tanque de laguna abierta de la Universidad del Valle de Guatemala
- Cámara de Neubauer
- Medio f/2 Guillard original
- Pipeta de 5 mL
- Pipeta pasteur
- Puntas de pipeta
- 2 Erlenmeyer de 500 mL
- 1 probeta de 500 mL
- 1 probeta de 50 mL
- 1 beaker de 250 mL
- 3 tubos de ensayo de 5 mL con rosca
- Estufa
- Microscopio LEICA DM500
- 2 agitadores magnéticos
- Papel aluminio
- Cinta adhesiva

- Marcador
- Kimwipes

Procedimiento:

1. Tomar 3 muestras de 5 mL con tubos de ensayo con rosca del cultivo del reactor abierto tipo laguna de la Universidad Del Valle de Guatemala.
2. Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
3. Con una pipeta Pasteur transferir muestra del cultivo recuperado a la cámara de Neubauer, procurando de llenar ambos pozos de la cámara.
4. Colocar la cámara en el microscopio y ajustar el lente a 10x.
5. Analizar la morfología de las microalgas y verificar si hay presencia de otros microorganismos.
6. Limpiar la cámara de Neubauer con agua y jabón y secar con un Kimwipe.
7. Repetir el procedimiento desde el paso 1 para las otras 2 muestras recuperadas del medio de cultivo.
8. Si los resultados son favorables para la presencia en mayor porcentaje de las microalgas *N. oculata*, proceder a recuperar cultivo de microalgas del tanque de laguna abierta de la Universidad Del Valle de Guatemala con un beaker de 250 mL previamente esterilizado.
9. Esterilizar etanol 2 Erlenmeyer de 500 mL y etiquetar como “1” y “2”.
10. Con una probeta previamente esterilizada de 500 mL medir 440 mL de agua destilada.
11. Transferir el agua destilada al Erlenmeyer 1.
12. Repetir el procedimiento del paso 2 y 3 con Erlenmeyer 2.
13. Con la pipeta medir 10 mL del medio f/2 Guillard original y transferir al Erlenmeyer 1 y repetir con el Erlenmeyer 2.
14. Agregar un agitador magnético a cada solución.
15. Trasladar los Erlenmeyer a una estufa y configurar la agitación a un nivel 5 por 5 minutos.
16. Medir con la probeta de 50 mL previamente esterilizada 50 mL del cultivo de microalgas recuperado anteriormente.
17. Configurar la agitación de las estufas a un nivel 3.
18. Transferir los 50 mL del cultivo de microalgas al Erlenmeyer 1.
19. Agitar la solución hasta conseguir un medio homogéneo.

20. Repetir el procedimiento desde el paso 9 para el Erlenmeyer 2.
21. Rotular los Erlenmeyer como “Cultivo de microalgas” y tapar con aluminio.
22. Trasladar los Erlenmeyer al frente de las luces led rojas y dejar crecer las microalgas por 1 semana.
23. Agitar 1 vez al día por 20 segundos el medio de cultivo para favorecer el crecimiento.
24. Al cabo de la semana, transferir el cultivo de microalgas de ambos Erlenmeyer a un reactor cada uno, los cuales cuenten con un volumen final de 5 L con medio de cultivo f/2 modificado con una concentración de 0.150 g de NaNO_3/L .
25. Dejar crecer las microalgas por 3 semanas para poder utilizarlas como inóculos para la experimentación.
26. Monitorear diariamente el crecimiento celular con el equipo Muse® y el consumo de nitratos con el equipo HACH DR 890.
27. Al término de las 3 semanas retirar el cultivo de los reactores y transferir cada uno a un envase de plástico previamente esterilizado.
28. Los cultivos de microalgas deberán ser refrigerados a 5°C.

3. Preparación del inóculo para la experimentación

Materiales y equipo:

- Cultivo de microalgas obtenido previamente en medio de cultivo con una concentración de 0.300 g de NaNO_3/L .
- 2 Erlenmeyer de 500 mL
- 1 probeta de 500 mL
- Papel aluminio
- Cinta adhesiva
- Marcador

Procedimiento:

1. Esterilizar con etanol 2 Erlenmeyer de 500 mL y etiquetar como “1” y “2”.
2. Con una probeta previamente esterilizada de 500 mL medir 500 mL de cultivo de microalgas con una concentración de 0.3 g de NaNO_3/L , previamente obtenido y en refrigeración.

3. Transferir los 500 mL de cultivo de microalgas al Erlenmeyer 1, tapar con papel aluminio e identificar debidamente con cinta adhesiva.
 4. Repetir el procedimiento desde el paso 2 para el Erlenmeyer 2.
 5. Trasladar los Erlenmeyer al lado de los fotobiorreactores para que el cultivo reciba la luz roja y dejarlos por 24 horas antes de transferirlos al nuevo cultivo de microalgas.
4. Cultivo en fotobiorreactores, variando la concentración de nitrógeno, manteniendo constante el tiempo de iluminación, la intensidad de iluminación, el pH, la salinidad y el flujo de aire

Materiales y equipo:

- Fotobiorreactores de columna de 8 L BioVantage (incluyendo los compresores y la estructura de metal)
- Microscopio LEICA DM500
- 2 barras de luces led roja de 1500 lúmenes
- 4 pinzas universales
- Agua destilada
- 1 probeta de 500 mL
- 1 probeta de 100 mL
- 1 probeta de 1 L
- Estufa
- Agitador magnético
- Balanza analítica Pioneer OHAUS
- Tubos Eppendorf
- Inóculos preparados en el apartado 3
- Medio de cultivo f/2 modificado preparado en el apartado 1
- Solución de nitrato de sodio 0.25 M preparada en el apartado 1
- Sal de pecera marca Prodac

Procedimiento:

1. Esterilizar ambos fotobiorreactores, realizando lavadas con jabón y agua, cloro al 10%, etanol al 70% y agua destilada. Posteriormente secar totalmente con papel, colocar en la mesa de trabajo y etiquetar como “Reactor 1” y “Reactor 2”.

2. Lavar los difusores de aire con agua y restregar con un cepillo de dientes. Luego secar con papel y ajustarlos en su lugar en los fotobiorreactores.
3. Colocar las barras de luces led una enfrente de cada fotobiorreactor sujetadas con pinzas en la estructura de metal de los fotobiorreactores.
4. Esterilizar un beaker de 5 L, agregar un agitador magnético, colocar sobre una estufa y establecer el nivel de agitación a 7.
5. Medir con la probeta de 1 L previamente esterilizada 1 L de agua destilada y transferir al beaker de 5 L. El procedimiento se debe repetir hasta agregar 3.804L.
6. Medir 100 g de sal de pecera en una balanza analítica, colocándolos en un recipiente liviano de plástico. Luego trasladar al beaker de 5 L.
7. Medir con la probeta de 500 mL previamente esterilizada 111.11 mL del medio de cultivo concentrado f/2 Guillard modificado y vertir sobre el beaker de 5 L.
8. Medir con la probeta de 100 mL previamente esterilizada 70.6 mL de nitrato de sodio 0.25 M, para que el medio tenga una concentración de 0.3 g de NaNO_3/L , y vertir sobre el beaker de 5 L.
9. Agitar la solución por 5 minutos y al terminar trasladar a uno de los fotobiorreactores
10. Encender el compresor de aire del fotobiorreactor y ajustar el flujo a $1.18 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$ (15.00 ft^3/h).
11. Lavar el beaker de 5 L con agua y jabón y secar con papel.
12. Repetir el procedimiento desde el paso 4 para agregar el medio de cultivo al segundo fotobiorreactor.
13. Agregar los inóculos de 500 mL preparados en el paso 3 a cada uno de los fotobiorreactores.
14. Conectar las luces led a una regleta conectada a la fuente de poder con un temporizador. Ajustar el temporizador para que las luces funcionen por 8 horas, encendiendo a las 11 am y apagándose a las 7 pm.
15. Dejar los fotobiorreactores fermentando por 3 semanas.
16. Al final de la fermentación, tomar una muestra de las células presentes en el cultivo mediante un eppendorf de 1.5 mL.
17. La muestra debe trasladarse a un microscopio para observar las características morfológicas de las células que crecieron en los reactores y analizar si estas coincidían con las esperadas para la especie *N. oculata*.

18. Repetir todo el procedimiento para las concentraciones iniciales de nitratos de 0.15 g de NaNO_3/L , 0.075 g de NaNO_3/L y 0.03 g de NaNO_3/L . Para eso se debe agregar 35.30 mL, 17.65 mL y 7.06 mL de la solución de nitrato de sodio 0.25 M, respectivamente. Cabe resaltar que en cada caso se debe aforar con el agua destilada hasta llegar a un volumen final de 5 L.

5. Toma de muestras y medición de pH, salinidad y temperatura

Materiales y equipo:

- 2 beakers de 50 mL
- Potenciómetro PCSTestr 35 – Multi Parameter
- Medidor de bolsillo de salinidad ATAGO.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Piseta de agua destilada
- KimWipes

Procedimiento:

1. Abrir la válvula de un fotobiorreactor y llenar con 2 mL del cultivo del reactor un beaker de 50 mL previamente esterilizado. Esto con el fin de vaciar la válvula con el medio de cultivo que haya quedado estancado en ella desde el día anterior.
2. Desenroscar los seguros de la parte superior del fotobiorreactor y vertir nuevamente dentro del fotobiorreactor los 2 mL recuperados.
3. Abrir nuevamente la válvula del reactor y llenar un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente esterilizado con el medio de cultivo.
4. El eppendorf debe ser etiquetado con la fecha, el número de muestra de la experimentación y el número del reactor del que se tomó la muestra. Por ejemplo: 25/07/2022 “1.1”.
5. Abrir nuevamente la válvula del reactor y llenar con 25 mL de medio de cultivo un beaker de 50 mL previamente esterilizado.
6. Limpiar con agua destilada y secar con KimWipes el potenciómetro y el medidor de salinidad.
7. Vertir 1 mL del medio de cultivo sobre el medidor de salinidad y presionar el botón “Start” para encender el equipo e iniciar la lectura. Al terminar anotar los valores de salinidad y temperatura que brinda el equipo.

8. Voltear con cuidado el medidor de salinidad sobre el eppendorf para recuperar el volumen del medio de cultivo.
9. Lavar con agua destilada y secar con KimWipes el medidor de salinidad.
10. Medir el pH de la muestra obtenida en el beaker del paso 4. Anotar la medida hasta que esta se estabilice.
11. Devolver al reactor el volumen de medio de cultivo recuperado en el beaker del paso 4 y enroscar nuevamente los seguros de la parte superior del fotobiorreactor.
12. Lavar con agua destilada y secar con KimWipes el potenciómetro.
13. Repetir todo el procedimiento con el medio de cultivo del segundo fotobiorreactor.
14. Los 2 eppendorf con muestra reservarlos para realizar el conteo celular y la cuantificación de nitratos.

6. Conteo celular y análisis de viabilidad en analizador de células Muse®

Materiales y equipo:

- Contador de células Muse®
- Vortex
- 1 micropipeta de 100 a 1000 μ L
- Puntas de micropipeta
- Piseta de cloro
- Piseta de agua destilada
- Recipiente con Guava ICF

Procedimiento:

1. Encender el equipo Muse®.
2. Seleccionar la cuenta personal e ingresar el PIN de acceso.
3. Seleccionar la opción “Muse System Cleaning”
4. Seleccionar la opción “Complete System Clean”
5. Seleccionar la opción “Run Complete Clean”
6. Cuando el brazo que va al capilar baje del equipo, retirar el tubo con agua destilada y colocar una nuevo lleno de Guava ICF.
7. Seleccionar la opción “Run” y esperar a que el equipo termine el procedimiento.

8. Cuando el brazo que va al capilar baje nuevamente, retirar el tubo con Guava ICF y colocar uno nuevo con agua destilada fresca.
9. Seleccionar la opción “Continue” y esperar a que el equipo termine el procedimiento.
10. Al terminar el equipo seleccionar la opción “Finish”.
11. Seleccionar la opción “Home”, luego “Count & Viability” y luego el archivo donde corresponde guardar la muestra a analizar.
12. Seleccionar la opción “Next Run” y esperar a que baje el brazo que va al capilar para retirar el tubo de agua destilada.
13. Con ayuda de la micropipeta, transferir 1 mL de muestra, de cada eppendorf de las muestras recolectadas de la fermentación, a un respectivo tubo de ensayo utilizado para el MUSE, previamente limpio.
14. Si la muestra está muy concentrada, transferir solo 0.1 mL de muestra a los tubos de ensayo, aforar a 1 mL con agua destilada y homogenizar la muestra con ayuda del vortex, cuidando de afectar las células.
15. Colocar un tubo con muestra de fermentación en el brazo del MUSE, subir hasta su posición en el capilar y seleccionar la opción “Continue”.
16. Colocar el nombre de la muestra, el volumen original de la muestra y el factor de dilución empleado y seleccionar la opción “Continue”.
17. Al terminar el análisis del conteo celular, anotar el resultado y regresar la muestra al eppendorf si esta no es diluida.
18. Repetir el mismo procedimiento para analizar la otra muestra de la fermentación.
19. Al terminar el último análisis repetir el protocolo de limpieza “Complete System Clean” y dejar un tubo con agua destilada dentro del equipo.
20. Seleccionar la opción “Essential Tools”, luego la opción “Power Options” y por último la opción “Power Off”.

7. Determinación de la concentración de nitratos con el equipo HACH DR 890

Materiales y equipo:

- Equipo HACH DR 890
- Vortex
- Pipeta de 1 mL
- Puntas de pipeta

- Caja de KimWipes®
- Sobres NitraVer 5
- Pipeta de agua destilada

Procedimiento:

1. Buscar el método para cuantificar nitratos en el rango más alto (0-500 mg/L) en el manual del equipo HACH DR 890.
2. Transferir 1 mL de la muestra de fermentación al tubo del equipo HACH y aforar a 10 mL con agua destilada.
3. Homogenizar la muestra con el vortex y limpiar con un kimwipe para eliminar suciedad de las paredes.
4. Encender el equipo HACH DR 890 presionando el botón correspondiente.
5. Presionar el botón “PRGM 7”, luego presionar los botones “TIME 5”, “STORE 1” y “ENTER”.
6. Colocar el tubo de ensayo con la muestra dentro del equipo, colocar la tapadera y presionar el botón “ZERO” para tomar el blanco de la medición.
7. Retirar el tubo del equipo, retirar su tapadera, abrir un sobre de NitraVer5, vertir el contenido sobre la muestra dentro del tubo y cerrar el tubo.
8. Presionar el botón “TIMER” y esperar a que aparezca el temporizador de 1 minuto.
9. Presionar el botón “ENTER” y homogenizar la mezcla del tubo con el vortex.
10. Al acabar el tiempo, dejar de mezclar la muestra, presionar nuevamente el botón “TIMER” y “ENTER” y dejar reposar la muestra por los 5 minutos del temporizador.
11. Al terminar, limpiar el tubo nuevamente con un Kimwipe.
12. Trasladar el tubo de ensayo al equipo HACH DR 890 y colocar la tapadera.
13. Presionar el botón “READ” y esperar a que el equipo muestre la concentración de nitratos de la muestra para anotarla.
14. Retirar el tubo del equipo y vertir su contenido en el envase de desechos del equipo.
15. Lavar el tubo con agua y jabón y secar con papel.
16. Repetir el mismo procedimiento para la otra muestra de fermentación.

8. Determinación del modelo matemático que describe el crecimiento celular y el consumo de nitratos a distintas concentraciones con el software Berkeley Madonna

Materiales y equipo:

- Computadora
- Software Berkeley Madonna
- Microsoft Excel

Procedimiento:

1. En una nueva hoja de cálculo de Excel se colocar en la primera columna los días de fermentación y en la segunda columna la concentración celular, en células/mL, de cada día obtenido del analizador MUSE.
2. Guardar el archivo como .CSV y con el nombre correspondiente de la fermentación en análisis.
3. En un nuevo archivo de Excel repetir el procedimiento del paso 1 y 2 para los días de fermentación y la concentración de nitratos en g/mL.
4. Abrir el software Berkeley Madonna.
5. Presionar las opciones “File” y “New”.
6. En la columna izquierda del archivo igualar el “STARTTIME” a 0 y el “STOPTIME” a 21, puesto que las fermentaciones durarán 21 días. Por último, se definir el “DT” como 0.02.
7. En la columna izquierda del archivo escribir las ecuaciones a iterar las cuales deben ser:
 - $u = (u_{max} * (S - S_f)) / (K_s + (S - S_f))$
 - $R_X = u * X$
 - $R_S = R_X / Y_x$
8. Definir la concentración final de sustrato acorde a lo reportado en la fermentación. En la fermentación x1.00 definir como $S_f = 0.00008878$.
9. Definir las siguientes variables con números arbitrarios: a, b1, b2, b3, b4, c. Estas se definen como los parámetros cinéticos para los días de fermentación en días hábiles.
10. Definir las siguientes variables con números arbitrarios: w, bf, z. Estas se definen como los parámetros cinéticos para los días de fermentación en fines de semana.

11. Los parámetros cinéticos se deben definir por intervalos de tiempo de la siguiente manera:

- $u_{max} = \text{IF TIME} < 3 \text{ THEN } a \text{ ELSE IF TIME} < 6 \text{ THEN } w \text{ ELSE IF TIME} < 10 \text{ THEN } a \text{ ELSE IF TIME} < 13 \text{ THEN } w \text{ ELSE IF TIME} < 17 \text{ THEN } a \text{ ELSE IF TIME} < 20 \text{ THEN } w \text{ ELSE } a$
- $Y_x = \text{IF TIME} < 3 \text{ THEN } b_1 \text{ ELSE IF TIME} < 6 \text{ THEN } b_f \text{ ELSE IF TIME} < 10 \text{ THEN } b_2 \text{ ELSE IF TIME} < 13 \text{ THEN } b_f \text{ ELSE IF TIME} < 17 \text{ THEN } b_3 \text{ ELSE IF TIME} < 20 \text{ THEN } b_f \text{ ELSE } b_4$
- $K_s = \text{IF TIME} < 3 \text{ THEN } c \text{ ELSE IF TIME} < 6 \text{ THEN } z \text{ ELSE IF TIME} < 10 \text{ THEN } c \text{ ELSE IF TIME} < 13 \text{ THEN } z \text{ ELSE IF TIME} < 17 \text{ THEN } c \text{ ELSE IF TIME} < 20 \text{ THEN } z \text{ ELSE } c$

12. Definir los valores iniciales de X y S acorde a lo reportado en la fermentación.

En la fermentación x1.00 se debe definir INIT X = 45100 y INIT S=0.000291.

13. Por último se debe escribir los diferenciales $d/dt(X) = RX$ y $d/dt(S) = -RS$.

14. Luego presionar la opción “Parameters” y “Curve fit”.

15. Agregar las variables a iterar: a, b1, b2, b3, b4, c, w, bf, z.

16. En la opción “Fit Variable” seleccionar la variable X.

17. Presionar la opción “Import Dataset” y seleccionar el archivo .CSV creado anteriormente que corresponde a la concentración celular.

18. Repetir el paso 16 y 17 con la variable S y el archivo .CSV con la concentración de sustrato.

19. Habilitar la opción “Multiple Fits”, añadir las variables X y S anteriormente definidas y presionar el botón “OK”.

20. Luego seleccionar las opciones “Parameters” y “Define Sliders”.

21. Añadir las variables a, b1, b2, b3, b4, c, w, bf, z y presionar el botón “OK”.

22. Con las barras que aparecen en la parte inferior de la gráfica, modificar el valor de dichas variables hasta que la curva de crecimiento celular y concentración de sustrato se ajusten lo mejor posible.

23. Al obtener el resultado satisfactorio, presionar la opción “Table” de la gráfica y copiar toda la tabla en un nuevo archivo de Excel.

24. En el archivo Excel depurar los datos de modo que solo se puedan analizar los datos que corresponden a los días de fermentación analizados.

25. Por último, calcular el coeficiente R^2 entre los datos experimentales y los datos calculados con Berkeley Madonna de la concentración celular.

26. Repetir este último paso para los datos experimentales y calculados de la concentración de nitratos.
27. Repetir todo el procedimiento desde el paso 1 para los datos obtenidos de cada fermentación analizada.

9. Cosecha y secado de biomasa

Materiales y equipo:

- Centrífuga SORVALL RT7
- Balanza analítica Pioneer OHAUS
- Horno secador Symphony VWR
- Agua destilada
- Jabón
- Piseta de etanol al 70%
- Piseta de cloro al 10%
- Papel
- 4 envases de centrífuga de 250 mL
- Envase de plástico de 8 L
- 1 beaker de 500 mL
- 1 erlenmeyer de 4 L
- Recipientes de metal
- Recipientes de porcelana
- Cajas petri de vidrio
- Espátula analítica
- Embudo

Procedimiento:

1. Lavar los envases de centrífuga y el envase de plástico de 8 L con agua y jabón, luego con etanol al 70% y con cloro al 10%. Posteriormente secarlos con papel.
2. Apagar el compresor de cada fotobiorreactor y apagar las luces.
3. Retirar la tapa del fotobiorreactor y trasvasar el contenido al envase de plástico de 8 L, utilizando el embudo sobre este envase para evitar derrames. Por último, cerrar el envase de plástico.

4. Colocar el embudo sobre uno de los envases de centrífuga y llenar por completo.
5. Repetir el procedimiento hasta llenar todos los envases de centrífuga.
6. Pesar los envases de centrífuga en la balanza para corroborar que tengan el mismo peso.
7. Si no cuentan con el mismo peso, trasvasar volumen entre ellos hasta lograr que pesen lo mismo.
8. Colocar los envases dentro de la centrífuga y configurar el equipo a 20 °C y 3000 rpm por 10 minutos.
9. Al terminar, retirar los envases de centrífuga.
10. Trasvasar el sobrenadante al Erlenmeyer de 4 L y el pellet, junto con un poco de medio, trasvasar al beaker de 500 mL.
11. Repetir procedimiento desde el paso 4 hasta agotar los 5 L de medio de cultivo del fotobiorreactor.
12. Repetir procedimiento desde el paso 4 hasta agotar el sobrenadante que se recuperó en el Erlenmeyer de 4 L, pero configurando la centrífuga a 20 °C y 4000 rpm por 10 minutos.
13. El sobrenadante final se descartarlo en el reactor abierto de laguna abierta para aprovechar los nutrientes del medio de cultivo que pudieron haber quedado en el medio.
14. Distribuir la solución de pellets sobre los recipientes de metal y de porcelana y sobre las cajas petri de vidrio.
15. Trasladar los recipientes y las cajas petri hacia el horno secador, donde se dejarán por 24 horas a 60 °C.
16. Al término del secado, raspar la biomasa de los recipientes y de las cajas petri con la espátula analítica y trasladar a una caja petri previamente tarada.
17. Pesar la biomasa recuperada en la balanza analítica.
18. Repetir procedimiento con el cultivo del segundo fotobiorreactor.

10. Extracción y recuperación de aceite de la biomasa cosechada

Materiales y equipo:

- Horno secador Symphony VWR
- Contador de células Muse
- Kit de destilación

- Licuadora marca OSTER
- 1 balanza analítica
- 1 estufa con agitación
- 6 beakers de 250 ml
- 1 probeta de 50 mL
- Recipiente de metal
- Caja petri de vidrio
- 1 agitador magnético
- 1 ampolla de decantación
- 1 soporte universal
- 1 llave para sujetar la ampolla al soporte
- Aceite vegetal mara Ideal
- Solución cloroformo:metanol (2:1)
- Piseta de agua destilada
- Papel aluminio
- Tape
- Marcador negro

Procedimiento:

1. Si los resultados muestran que con la licuadora se logra el mayor porcentaje de lisis celular, transferir la biomasa cosechada a la licuadora.
2. Agregar 50 mL de agua destilada medida con la probeta de 50 mL
3. Ajustar la licuadora al nivel 1 y licuar por 15 minutos.
4. Transferir la solución a un beaker de 250 mL.
5. Agregar 20 veces en peso la solución de cloroformo:metanol (2:1) respecto a la biomasa cosechada.
6. Agregar un agitador magnético al beaker y transferir a la estufa con agitación.
7. Agitar por 15 minutos en el nivel 8.
8. Al terminar transferir la solución a la ampolla de decantación y dejar decantar por 2 horas.
9. Drenar la fase acuosa en un beaker de 250 mL previamente rotulado.
10. Recuperar la fase orgánica en otro beaker de 250 mL previamente rotulado.

11. Transferir la fase orgánica al matraz del kit de destilación y destilar por 2 horas.
12. Pesar la masa recuperada en el matraz.
13. Repetir todo el procedimiento para la biomasa cosechada del segundo reactor.

11. Evaluación de los métodos de lisis celular

Materiales y equipo:

- Cultivo de microalgas obtenido previamente en medio de cultivo con una concentración de 0.300 g de NaNO_3/L .
- Licuadora marca OSTER
- Procesador ultrasónico marca dr. Hielscher UP100H
- Contador de células MUSE
- Estufa con agitación
- 2 probetas de 50 mL
- 10 Beakers de 100 mL
- 3 Beakers de 125 mL
- 40 tubos eppendorf
- 3 agitadores magnéticos
- Pipeta de 5 mL
- Puntas para pipeta
- Solución de HCl 1 M
- Papel aluminio
- Tape
- Marcador negro

Procedimiento para la lisis celular por estrés mecánico:

14. Tomar 3 muestras de 50 mL, con ayuda de la probeta de 50 mL, del cultivo de microalgas previamente cultivado en los fotobiorreactores y trasladar a un respectivo beaker de 100 mL.
15. Las muestras se deben tapar con aluminio hasta su uso y etiquetar con tape según su número como “Muestra 1”.

16. Tomar una muestra de 1.5 mL del medio de cultivo y trasladarla a un tubo eppendorf previamente etiquetado como inóculo.
17. Armar y conectar la licuadora OSTER.
18. Verter una de las muestras a la licuadora previamente limpia con agua y jabón.
19. Tapar la licuadora y encenderla, llevándola al nivel 1 de agitación que corresponde a 12000 rpm.
20. Poner el temporizador de 5 minutos y al terminar apagar la licuadora.
21. Con la pipeta tomar una muestra de 1 mL y trasladarla a un tubo eppendorf etiquetado como “Muestra 1: licuadora 5 minutos”.
22. Volver a poner el temporizador de 5 minutos y encender la licuadora por ese tiempo.
23. Al terminar, repetir el paso 8 y etiquetar la muestra como “Muestra 1: licuadora 10 minutos”.
24. Repetir el paso 9 y 10 y etiquetar la muestra como “Muestra 1: licuadora 15 minutos”.
25. Repetir el procedimiento con las muestras 2 y 3 del medio de cultivo.
26. Al terminar, llevar las muestras al analizador de células MUSE y evaluar la viabilidad celular del inóculo y de las 9 muestras obtenidas del procedimiento.
27. Por último, analizar en qué tiempo de estrés mecánico por licuadora genera la mayor lisis celular en las microalgas.

Procedimiento para la lisis celular por ultrasonido:

1. Tomar 3 muestras de 50 mL, con ayuda de la probeta de 50 mL, del cultivo de microalgas previamente cultivado en los fotobiorreactores y trasladar a un respectivo beaker de 100 mL.
2. Las muestras se debe tapar con aluminio hasta su uso y etiquetar con tape según su número como “Muestra 1”.
3. Armar y conectar el procesador ultrasónico marca dr. Hielscher UP100H.
4. Configurar el equipo en el ciclo “1” y el porcentaje de amplitud a “50%”.
5. Colocar el beaker con la muestra 1 debajo de la punta del sonicador, de modo que esta quede sumergida hasta el fondo del beaker pero sin topar la cristalería.

6. Poner el temporizador de 5 minutos y presionar el botón para encender el equipo.
7. Al terminar el tiempo, apagar el equipo y con la pipeta tomar una muestra de 1 mL y trasladarla a un tubo eppendorf etiquetado como “Muestra 1: ultrasonido 50%: 5 minutos”.
8. Volver a poner el temporizador de 5 minutos y encender el equipo por ese tiempo.
9. Al terminar, repetir el paso 7 y etiquetar la muestra como “Muestra 1: ultrasonido 50%: 10 minutos”.
10. Repetir el paso 8 y 9 y etiquetar la muestra como “Muestra 1: ultrasonido 50%: 15 minutos”.
11. Repetir todo el procedimiento con las muestras 2 y 3 del medio de cultivo.
12. Repetir todo el procedimiento con 3 muestras nuevas y configurar el equipo a “100%” de amplitud.
13. Al terminar, llevar las muestras al analizador de células MUSE y evaluar la viabilidad celular de estas.
14. Por último, analizar en qué tiempo y bajo qué amplitud de onda, el ultrasonido genera la mayor lisis celular en las microalgas.

Procedimiento para la lisis celular por hidrólisis ácida con HCl:

1. Tomar 3 muestras de 50 mL, con ayuda de la probeta de 50 mL, del cultivo de microalgas previamente cultivado en los fotobiorreactores y trasladarlo a un respectivo beaker de 125 mL.
2. Las muestras se debe tapar con aluminio hasta su uso y etiquetar con tape según su número como “Muestra 1”.
3. Con la otra probeta medir 50 mL de la solución de HCl 1 M y verter sobre la muestra 1.
4. Conectar la estufa con agitación, añadir un agitador magnético al beaker con la muestra, trasladarlo a la estufa y configurar el nivel 3 de agitación.
5. Poner el temporizador de 5 minutos y presionar el botón para encender la estufa.
6. Al terminar el tiempo, apagar la estufa y con la pipeta tomar una muestra de 1 mL y trasladarlo a un tubo eppendorf etiquetado como “Muestra 1: HCl 5 minutos”.

7. Poner el temporizador de 5 minutos y encender la estufa por ese tiempo.
8. Al terminar, repetir el paso 6 y etiquetar la muestra como “Muestra 1: HCl 10 minutos”.
9. Repetir el paso 7 y 8 y etiquetar la muestra como “Muestra 1: HCl 15 minutos”.
10. Repetir todo el procedimiento con las muestras 2 y 3 del medio de cultivo.
11. Al terminar, llevar las muestras al analizador de células MUSE y evaluar la viabilidad celular de estas.
12. Por último, analizar en qué tiempo la hidrólisis ácida con HCl genera la mayor lisis celular en las microalgas.

Procedimiento para la lisis celular combinando los mejores métodos:

1. Después de analizar el porcentaje de lisis celular que se logra con cada método, verificar si se obtiene que el estrés mecánico con licuadora y el ultrasonido a 100% de amplitud de onda generan los mayores porcentajes de lisis celular. De ser así, proceder a combinarlos.
2. Tomar 3 muestras de 50 mL, con ayuda de la probeta de 50 mL, del cultivo de microalgas previamente cultivado en los fotobiorreactores y trasladarlo a un respectivo beaker de 100 mL.
3. Las muestras se deben tapar con aluminio hasta su uso y etiquetar con tape según su número como “Muestra 1”.
4. Armar y conectar el procesador ultrasónico marca dr. Hielscher UP100H.
5. Configurar el equipo en el ciclo “1” y el porcentaje de amplitud a “100%”
6. Colocar el beaker con la muestra 1 debajo de la punta del sonicador, de modo que esta quede sumergida hasta el fondo del beaker pero sin topar la cristalería.
7. Poner el temporizador de 7.5 minutos y presionar el botón para encender el equipo.
8. Al terminar el tiempo, apagar el equipo y trasladar la muestra a la licuadora OSTER previamente conectada y lista.
9. Poner el temporizador de 7.5 minutos y encender la licuadora, llevándola al nivel 1 de agitación que corresponde a 12000 rpm.

10. Al terminar, con la pipeta tomar una muestra de 1 mL y trasladarla a un tubo eppendorf etiquetado como “Muestra 1: 7.5 ultrasonido 100% y 7.5 licuadora”.
11. Repetir todo el procedimiento con las muestras 2 y 3 del medio de cultivo.
12. Repetir todo el procedimiento con 3 muestras nuevas y dándoles un tratamiento de 15 minutos en el ultrasonido y luego 15 minutos en la licuadora.
13. Al terminar, llevar las muestras al analizador de células MUSE y evaluar la viabilidad celular de estas.
14. Por último, analizar en qué combinación de tiempos el ultrasonido a una amplitud de onda del 100% junto con el estrés mecánico inducido por licuadora generan la mayor lisis celular en las microalgas.

12. Evaluación de los métodos de extracción de aceite con solventes

Materiales y equipo:

- Horno secador Symphony VWR
- Contador de células Muse
- Kit de destilación
- Biomasa de microalgas cultivadas en el reactor abierto tipo laguna de la Universidad del Valle de Guatemala
- 1 balanza analítica
- 1 estufa con agitación
- 6 beakers de 250 ml
- Recipiente de metal
- Caja petri de vidrio
- 3 agitadores magnéticos
- 1 ampolla de decantación
- 1 soporte universal
- 1 llave para sujetar la ampolla al soporte
- Aceite vegetal mara Ideal
- Solución cloroformo:metanol (2:1)
- Solución cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)

- Solución etanol:hexano (1:1)
- Tape
- Marcador negro

Procedimiento:

1. Con un beaker de 250 mL recuperar biomasa húmeda del reactor abierto tipo laguna de la Universidad del Valle de Guatemala.
2. La biomasa trasladarla a un recipiente de metal el cual debe ser llevado al horno secador por 24 horas a 60 °C.
3. Con una espátula analítica raspar la biomasa seca y pasarlo a una caja Petri de vidrio previamente tarada.
4. Pesar la biomasa hasta conseguir 2.5 g.
5. La biomasa se debe trasladar a un beaker de 250 mL previamente tarado.
6. Trasladar el beaker a la balanza analítica y verter aceite vegetal marca Ideal hasta conseguir también 2.5 g.
7. Tarar la balanza y agregar al beaker anterior 20 veces en peso de la biomasa orgánica (biomasa más aceite vegetal) solución de cloroformo:metanol (2:1), aproximadamente 100 g de solución.
8. Agregar un agitador magnético al beaker y trasladarlo a una estufa con agitación.
9. Configurar la agitación al nivel 8 y dejar en agitación por 15 minutos.
10. Luego trasladar la mezcla a una ampolla de decantación, colocada en su soporte.
11. Tapar la ampolla, voltear en forma horizontal y agitar tomándola de ambos extremos sin tocar la válvula. Después de cada agitación, colocar el embudo boca arriba y abrir la válvula cuidadosamente para liberar la presión. Se debe agitar 5 veces.
12. Luego dejar la ampolla nuevamente en su soporte y dejar decantar por 2 horas hasta lograr la separación de las fases.
13. Colocar un beaker de 250 mL rotulado como “refinados” debajo de la válvula de salida de la ampolla.
14. Abrir la válvula de la ampolla lentamente y drenar la fase que contiene la biomasa, hasta llegar a la sección de la ampolla en la cual se forma un anillo entre la fase orgánica y la fase acuosa. En este punto cerrar la válvula.

15. Luego transferir la fase orgánica hacia otro beaker de 250 mL rotulado como “extractos”, para lo cual se debe voltear la ampolla de modo que la fase salga por la parte superior.
16. Transferir la fase orgánica hacia el matraz correspondiente, previamente tarado, del kit de destilación previamente armado.
17. Colocar el matraz en la estructura del kit y comenzar a calentar la solución.
18. Calentar hasta llegar a los 65 °C, a partir de donde se debe mantener constante la temperatura por 2 horas hasta que todo el solvente se evapore.
19. Al finalizar la evaporación detener el calentamiento y esperar a que el sistema se enfríe.
20. Pesarse el matraz donde está la solución orgánica para determinar la cantidad de aceite recuperado.
21. Los condensados transferirlos a un recipiente de vidrio para su posterior reutilización.
22. Repetir la destilación para la fase acuosa para recuperar el solvente.
23. El condensado trasladarlo a su respectivo recipiente para su posterior reutilización y la materia orgánica descartarla en la basura.
24. Repetir todo el procedimiento dos veces más para obtener un triplicado.
25. Repetir todo el procedimiento 1 vez para cada una de las soluciones de cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) y etanol:hexano (1:1).
26. Analizar con qué mezcla de solventes se logra la mayor recuperación del aceite vegetal.

13. Preparación de soluciones

Materiales y equipo:

- Campana de extracción
- Ácido clorhídrico marca Merck
- Cloroformo marca Fischer
- Metanol marca Merck
- Etanol marca Merck
- Hexano marca Merck
- Agua destilada

- 4 beakers de 250 mL
- 1 beaker de 125 mL
- 1 probeta de 100 mL
- 1 probeta de 50 mL
- 1 matraz de aforo de L
- 3 recipientes de vidrio de 300 mL
- 1 recipiente de vidrio de 1.2 L
- 4 agitadores magnéticos
- Estufa con agitación
- Potenciómetro PCSTestr 35 – Multi Parameter

Procedimiento para preparar soluciones de solventes:

1. Transferir a un beaker de 125 mL cierto volumen de cloroformo.
2. Con ayuda de la probeta de 100 mL medir un total de 167 mL de cloroformo del beaker del paso anterior y transferirlos a un beaker de 250 mL.
3. Repetir el mismo procedimiento pero midiendo 83 mL de metanol, los cuales se transfieren al mismo beaker del paso anterior.
4. Agregar un agitador magnético al beaker y transferir a la estufa con agitación.
5. Agitar la solución por 5 minutos y transferir a un recipiente de vidrio previamente esterilizado y rotulado, obteniendo así 250 mL de la solución de solventes.
6. Almacenar el recipiente en oscuridad hasta su uso.
7. Repetir el mismo procedimiento para preparar la solución cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1), pero midiendo 146.9 mL de cloroformo, 77.33 mL de metanol y 25.78 mL de agua destilada.
8. Repetir el mismo procedimiento para preparar la solución etanol:hexano (1:1), pero midiendo 125 mL de etanol y 125 mL de hexano.

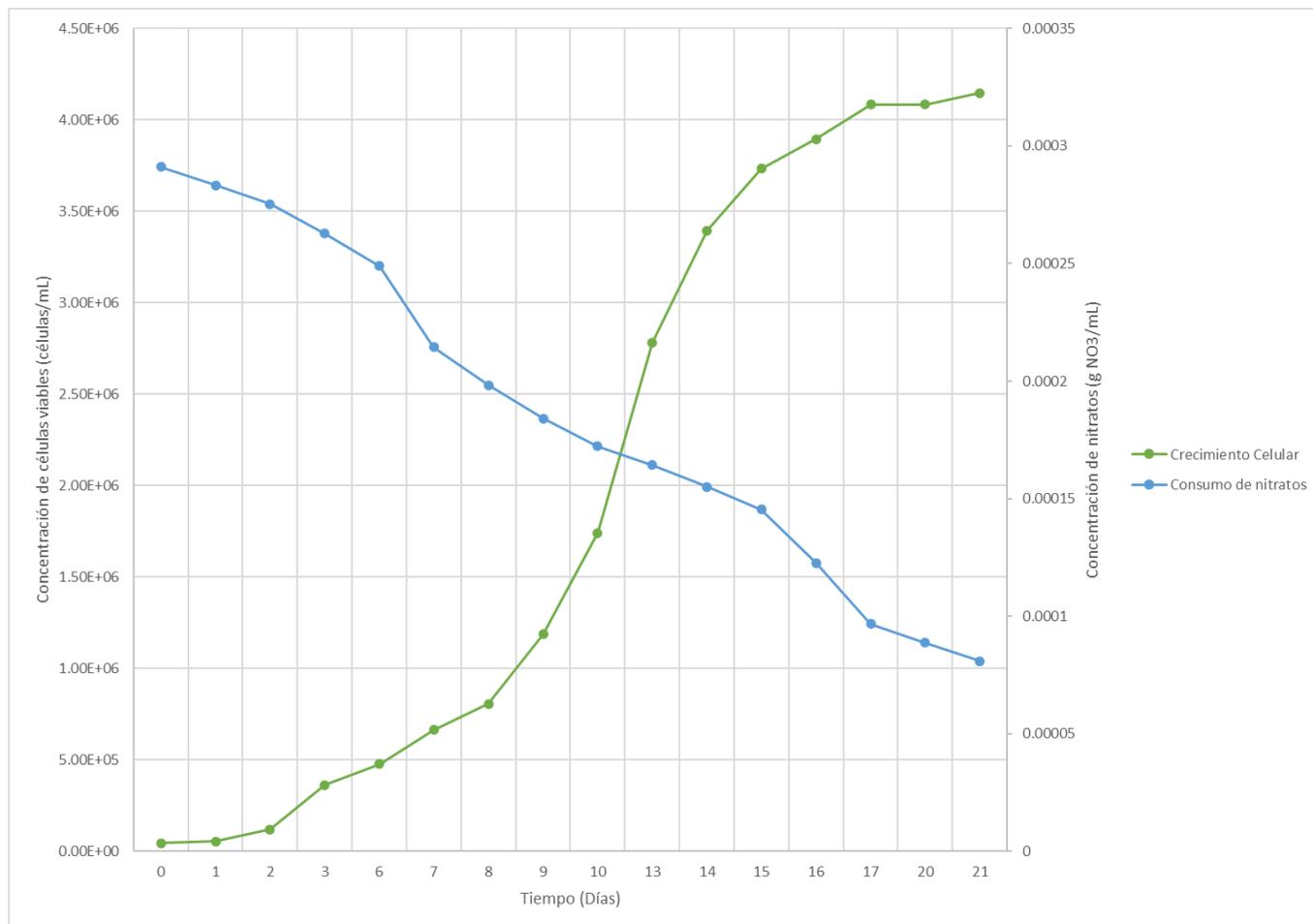
Procedimiento para preparar solución de ácido clorhídrico 1 M:

1. Transferir a un beaker de 125 mL cierto volumen de HCl bajo la campana de extracción.
2. Con ayuda de la probeta de 100 mL medir un total de 113.94 mL de HCl del beaker del paso anterior y transferirlos a un matraz de aforo de 1 L.

3. Aforar dicho matraz hasta 1 L y agitar cuidadosamente hasta que la mezcla se homogenice.
4. Transferir la solución al recipiente de vidrio de 1.2 L y rotular adecuadamente.
5. Medir el pH de la solución con un potenciómetro.
6. Almacenar el recipiente en oscuridad hasta su uso.

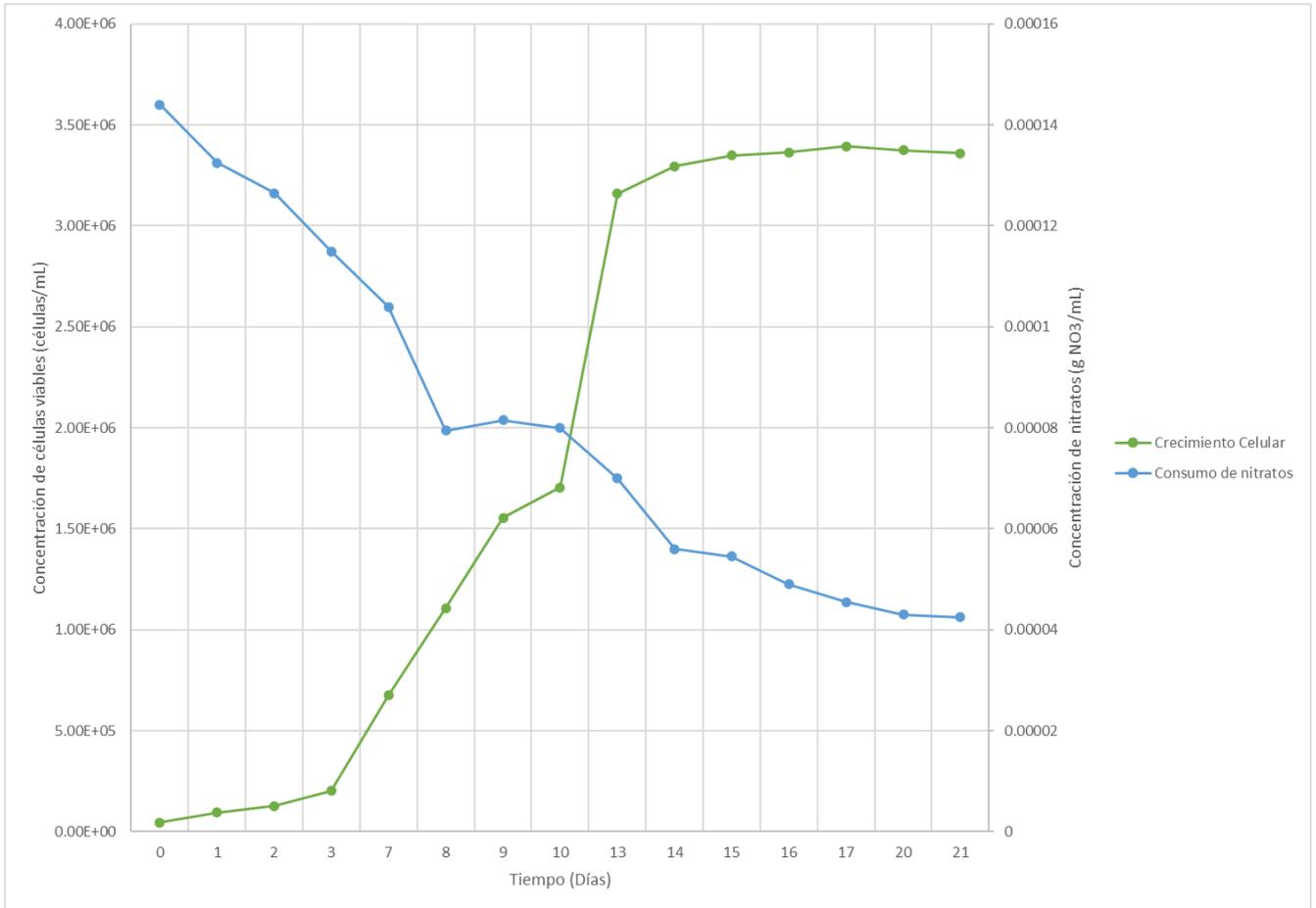
VII. RESULTADOS

Figura 16. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitrógeno de 0.300 g NaNO₃/L (x1.00)



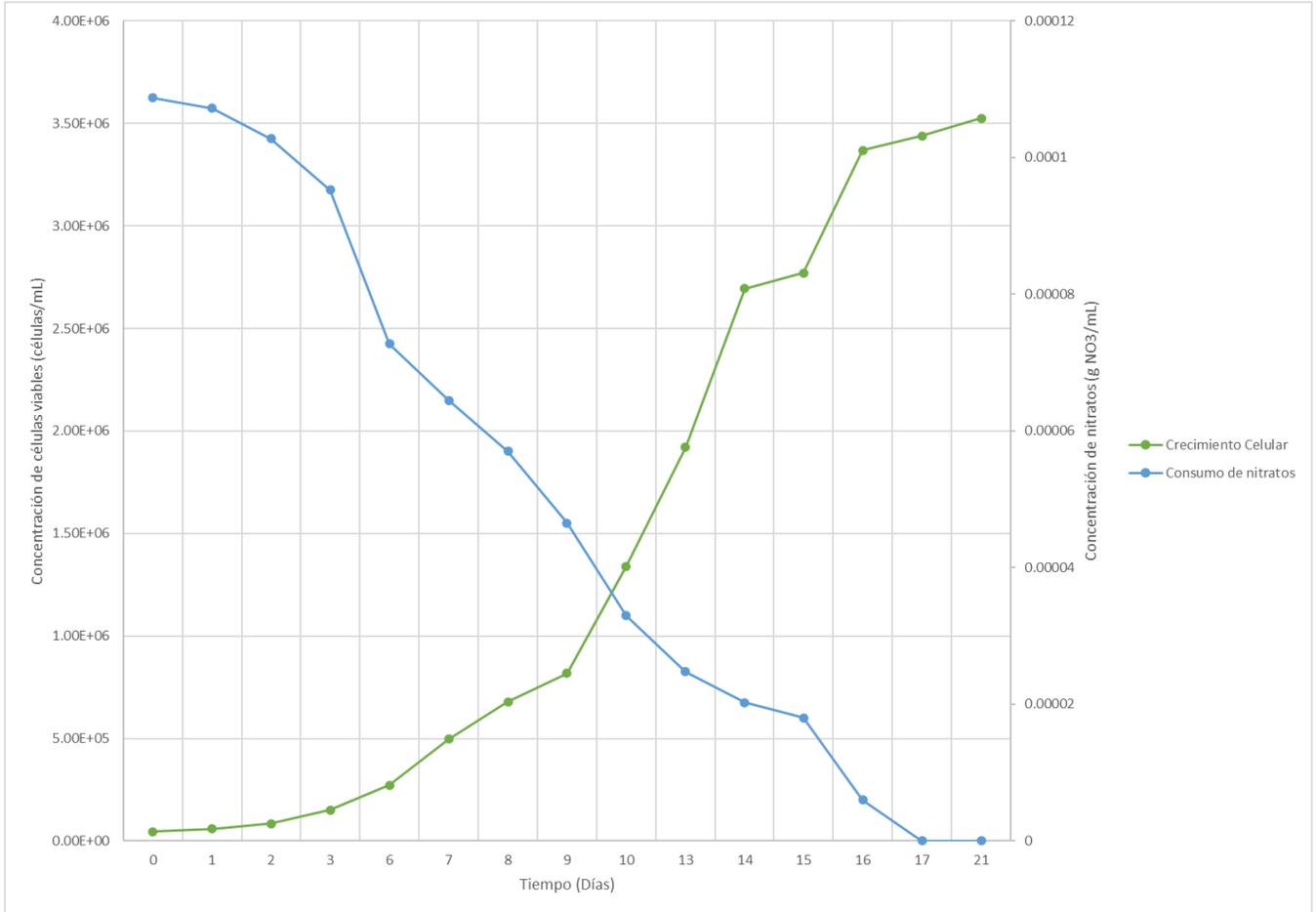
Experimentación realizada en triplicado por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L, a una viabilidad promedio de 79.91 ± 2.27 %, con un flujo constante de aireación de 1.18×10^{-4} m³/s (15.00 ft³/h), un pH promedio de 8.19 ± 0.06 , una salinidad promedio de $2.04\% \pm 0.01\%$ (m/m), una temperatura promedio de 21.28 °C ± 0.21 °C, una presión atmosférica de 0.974 atm, un ciclo de iluminación de 8 horas de luz a una intensidad de 1500 lúmenes y 16 horas de oscuridad y utilizando nitrato de sodio como la fuente de nitrato a una concentración x1.00. Equipo utilizado para analizar la concentración celular: MUSE®. Equipo utilizado para analizar la concentración de nitratos: HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 43 y Cuadro 45.

Figura 17. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitrógeno de 0.150 g NaNO₃/L (x0.50)



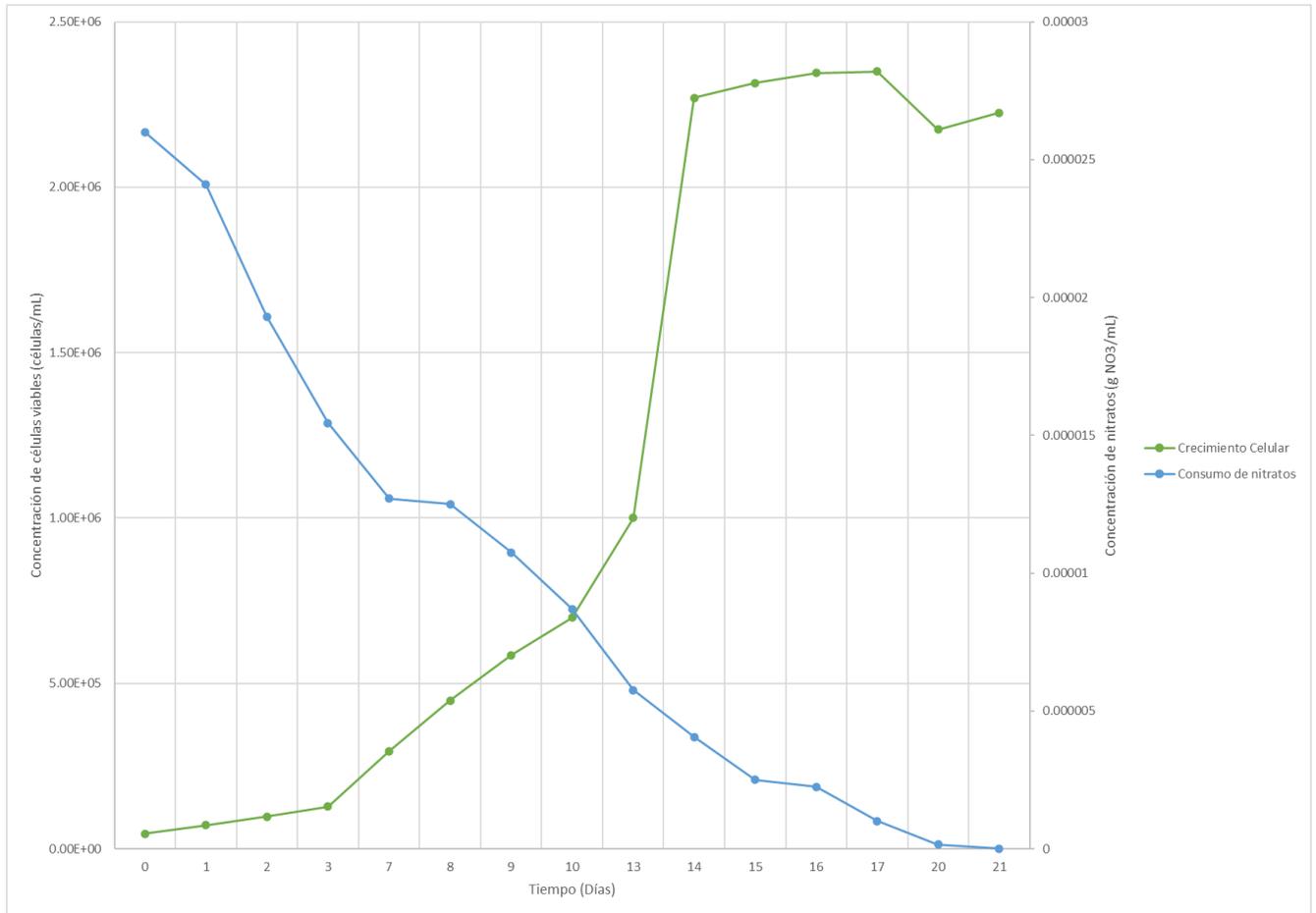
Experimentación realizada en triplicado por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L, a una viabilidad promedio de 76.57 ± 4.80 %, con un flujo constante de aireación de 1.18×10^{-4} m³/s (15.00 ft³/h), un pH promedio de 8.27 ± 0.06 , una salinidad promedio de $2.01\% \pm 0.01\%$ (m/m), una temperatura promedio de $21.71 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.21 \text{ }^\circ\text{C}$, una presión atmosférica de 0.974 atm, un ciclo de iluminación de 8 horas de luz a una intensidad de 1500 lúmenes y 16 horas de oscuridad y utilizando nitrato de sodio como la fuente de nitrato a una concentración x0.50. Equipo utilizado para analizar la concentración celular: MUSE[®]. Equipo utilizado para analizar la concentración de nitratos: HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 49 y Cuadro 51.

Figura 18. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitratos de 0.075 g NaNO₃/L (x0.25)



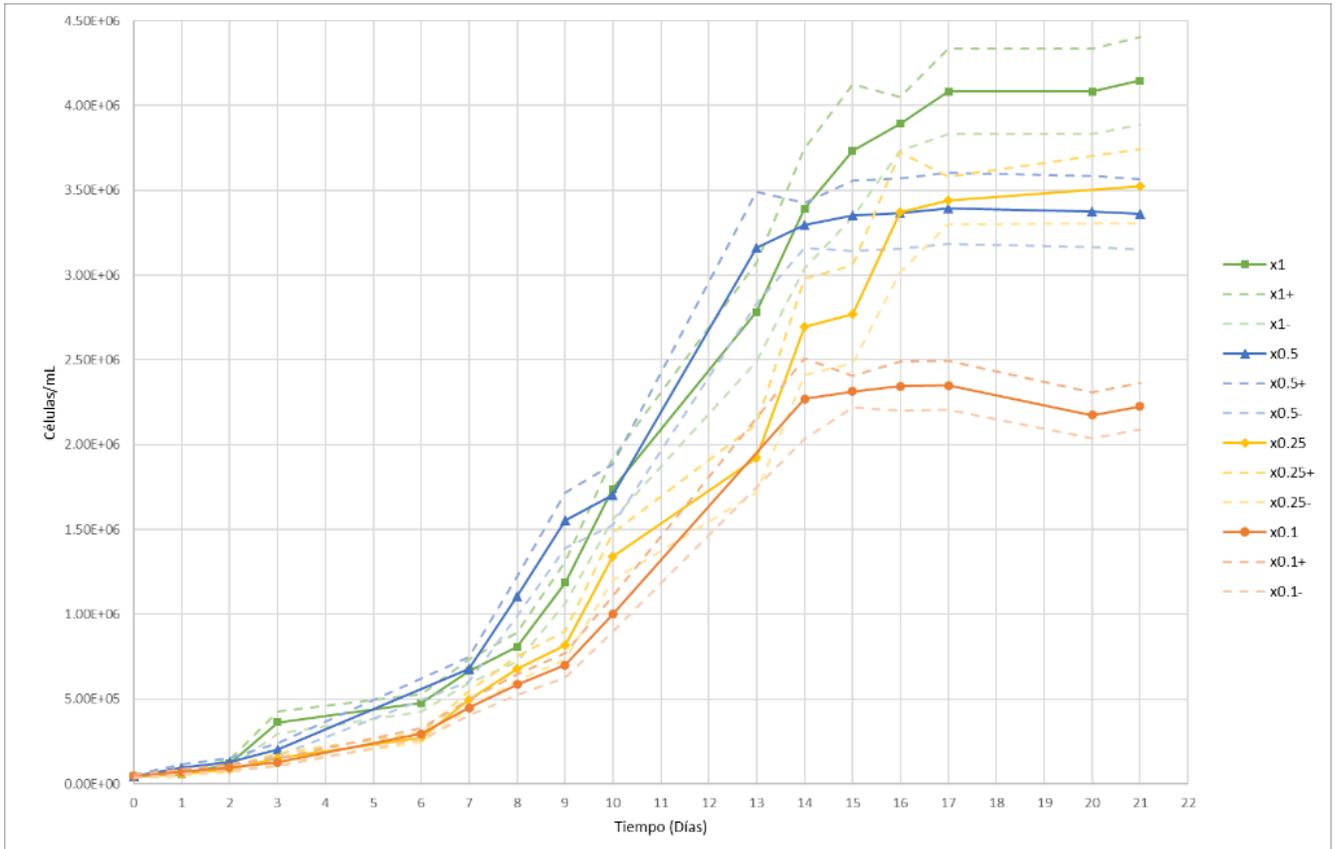
Experimentación realizada en triplicado por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L, a una viabilidad promedio de 78.20 ± 3.30 %, con un flujo constante de aireación de 1.18×10^{-4} m³/s (15.00 ft³/h), un pH promedio de 8.20 ± 0.06 , una salinidad promedio de $2.03\% \pm 0.01\%$ (m/m), una temperatura promedio de 21.03 °C ± 0.21 °C, una presión atmosférica de 0.974 atm, un ciclo de iluminación de 8 horas de luz a una intensidad de 1500 lúmenes y 16 horas de oscuridad y utilizando nitrato de sodio como la fuente de nitrato a una concentración x0.25. Equipo utilizado para analizar la concentración celular: MUSE®. Equipo utilizado para analizar la concentración de nitratos: HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 54 y Cuadro 56.

Figura 19. Comparación promedio del crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* contra el consumo de nitratos a una concentración de la fuente de nitratos de 0.030 g NaNO₃/L (x0.10)



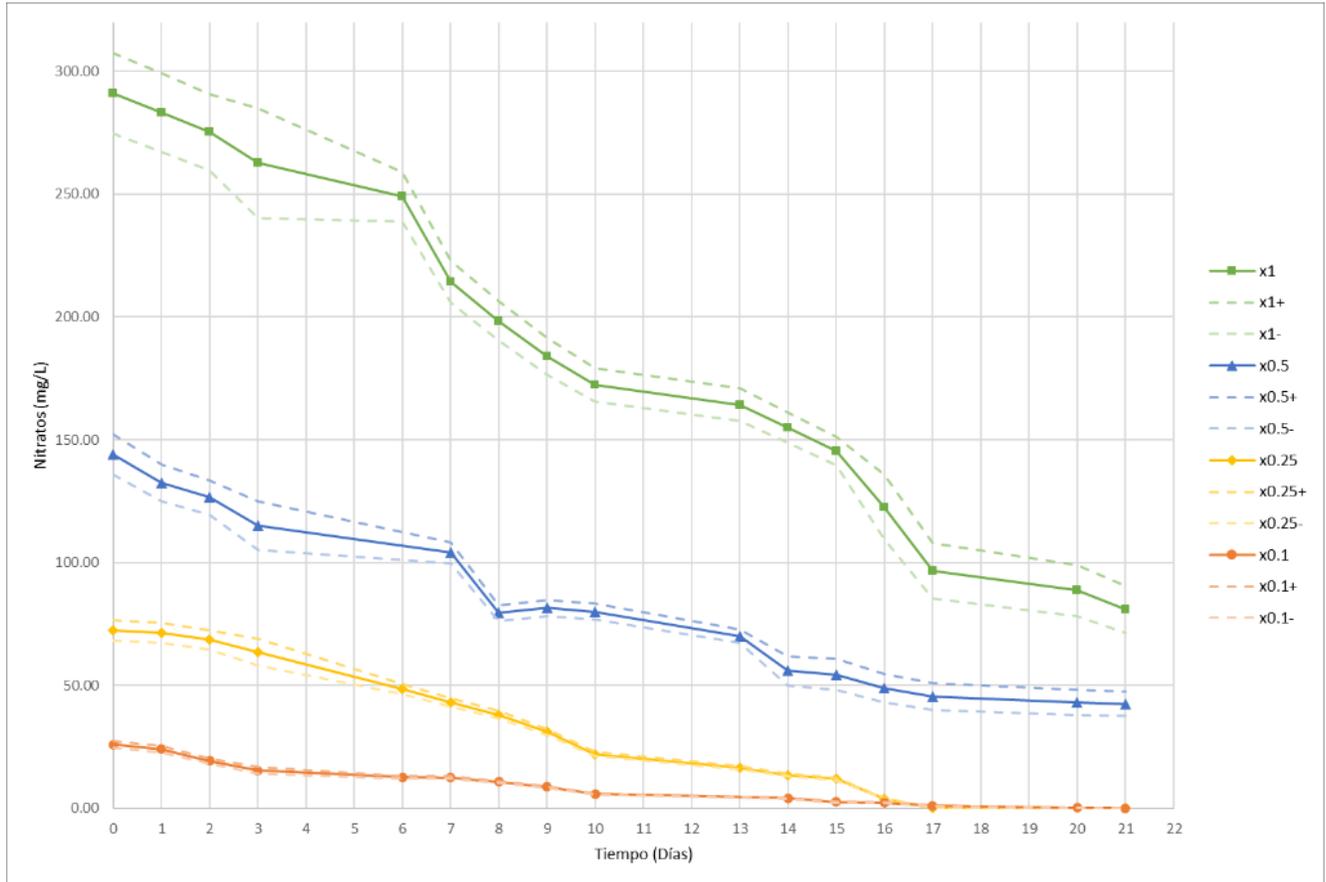
Experimentación realizada en triplicado por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L, a una viabilidad promedio de 73.82 ± 3.79 %, con un flujo constante de aireación de 1.18×10^{-4} m³/s (15.00 ft³/h), un pH promedio de 8.34 ± 0.06 , una salinidad promedio de $2.01\% \pm 0.01\%$ (m/m), una temperatura promedio de 21.19 °C ± 0.21 °C, una presión atmosférica de 0.974 atm, un ciclo de iluminación de 8 horas de luz a una intensidad de 1500 lúmenes y 16 horas de oscuridad y utilizando nitrato de sodio como la fuente de nitrato a una concentración x0.10. Equipo utilizado para analizar la concentración celular: MUSE®. Equipo utilizado para analizar la concentración de nitratos: HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 59 y Cuadro 61.

Figura 20. Comparación del crecimiento celular promedio de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno



Experimentaciones realizadas por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L con un flujo constante de aireación de $1.18 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$ (15.00 ft^3/h), una presión atmosférica de 0.9971 atm, un ciclo de iluminación de 8 horas de luz y 16 de oscuridad, utilizando nitrato de sodio como la fuente de nitrato y bajo las condiciones descritas en las Figuras 16, 17, 18 y 19.

Figura 21. Comparación del consumo de nitrato promedio de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno



Experimentaciones realizadas por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L con un flujo constante de aireación de $1.18 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$ ($15.00 \text{ ft}^3/\text{h}$), un ciclo de iluminación de 8 horas de luz y 16 de oscuridad, utilizando nitrato de sodio como la fuente de nitrato y bajo las condiciones descritas en las Figuras 16, 17, 18 y 19.

Cuadro 1. Comparación de la duración de cada fase del crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Concentración de la fuente de nitrógeno	Fase Lag (Días)	Fase de aceleración (Días)	Fase exponencial (Días)	Fase de desaceleración (Días)	Fase estacionaria (Días)
x1.00	2	4	9	2	4
x0.50	2	5	6	2	6
x0.25	2	4	10	1	4
x0.10	2	4	8	1	6

Experimentaciones realizadas por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente con un flujo constante de aireación de $1.18 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$ (15.00 ft³/h), un rango de temperatura de 20 °C a 22 °C, un rango de pH de 7 a 8.5, una presión atmosférica de 0.9971 atm y un ciclo de iluminación de 8 horas de luz y 16 de oscuridad.

Cuadro 2. Comparación del tiempo de generación, productividad y rendimiento de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Concentración de la fuente de nitrógeno	Tiempo de generación (± 0.64 días)	Productividad (Células/L día)	Rendimiento total (Células/g NO ₃)
x1.00	3.03	$(2.46 \pm 0.26) \times 10^8$	$(1.95 \pm 0.21) \times 10^{10}$
x0.50	2.70	$(2.40 \pm 0.25) \times 10^8$	$(3.27 \pm 0.37) \times 10^{10}$
x0.25	2.76	$(2.08 \pm 0.22) \times 10^8$	$(4.80 \pm 0.40) \times 10^{10}$
x0.10	2.72	$(1.59 \pm 0.17) \times 10^8$	$(8.38 \pm 0.71) \times 10^{10}$

Experimentaciones realizadas por 21 días continuos en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente con un flujo constante de aireación de $1.18 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$ (15.00 ft³/h), un rango de temperatura de 20 °C a 22 °C, un rango de pH de 7 a 8.5, una presión atmosférica de 0.9971 atm y un ciclo de iluminación de 8 horas de luz y 16 de oscuridad. Los tiempos de generación se obtuvieron con el cálculo 20, las productividades se

obtuvieron con el cálculo 21 y los rendimientos totales se obtuvieron con el cálculo 22. Las propagaciones de errores se obtuvieron con los cálculos 24, 25 y 26.

Cuadro 3. Comparación de la biomasa recuperada, su rendimiento y el aceite recuperado de la producción de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Concentración de la fuente de nitrógeno	Recuperación de biomasa (± 0.0193 g)	Rendimiento de biomasa (g biomasa/g NO ₃)	Recuperación de aceite (± 0.0001 g)
x1.00	12.5005	11.9627 \pm 1.0822	0.0000
x0.50	11.2350	22.2380 \pm 2.0916	0.0000
x0.25	10.3586	28.7046 \pm 1.6232	0.0000
x0.10	9.1464	72.4731 \pm 4.0988	0.0000

Biomasa recuperada mediante 2 ciclos de centrifugación: 10 minutos a 3000 rpm y 10 minutos a 4000 rpm; secada por 24 horas en horno a 60 °C e hidrolizada con licuadora a 12000 rpm por 15 minutos. Aceite extraído con mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1) con agitación por 15 minutos y decantación por 24 horas. Posteriormente, el aceite se intentó recuperar con una destilación del solvente, sin embargo, se infiere que la cantidad de aceite producida fue muy pequeña para poder cuantificarla con la metodología empleada. Los rendimientos de biomasa se obtuvieron con el cálculo 23. Las propagaciones de errores se obtuvieron con los cálculos 24, 25 y 26.

Ecuación 12. Modelo matemático que describe la velocidad específica de crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times (S - S_f)}{K_s + (S - S_f)}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento celular, μ_{\max} es la velocidad específica máxima de crecimiento celular, S la concentración de sustrato, S_f la concentración final de sustrato y K_s la constante de afinidad al sustrato.

Ecuación 13. Modelo matemático que describe la velocidad del crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

$$RX = \mu X$$

En donde RX es la cantidad de células por volumen al día y X es la concentración de células por volumen.

Ecuación 14. Modelo matemático que describe la velocidad del consumo del sustrato limitante para el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

$$RS = \frac{RX}{Y_x}$$

En donde RS es la concentración del sustrato limitante por volumen por día y Yx el rendimiento de células por gramo del sustrato limitante.

Ecuación 15. Modelo matemático que describe el cambio de la concentración celular en el tiempo para el cultivo de microalgas *N. oculata* a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

$$\frac{d}{dt}(X) = RX$$

Ecuación 16. Modelo matemático que describe el cambio de la concentración del sustrato limitante en el tiempo para el cultivo de microalgas *N. oculata* a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

$$\frac{d}{dt}(S) = -RS$$

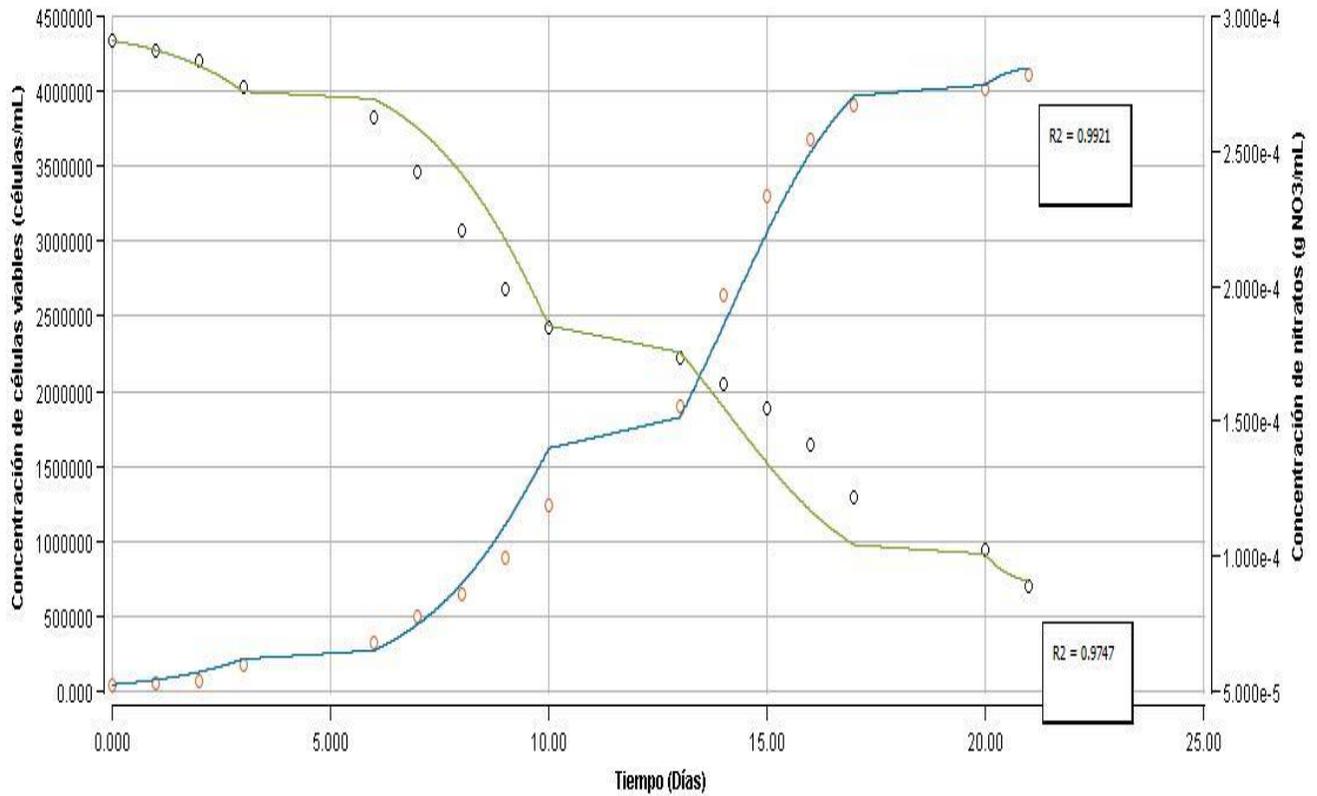
Cuadro 4. Parámetros cinéticos del modelo matemático que describe el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* a diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L obtenidos con el Software Berkley Madonna®

Parámetro	Simbología	Rango de tiempo (días)	Concentración inicial de nitratos x1.00	Concentración inicial de nitratos x0.50	Concentración inicial de nitratos x0.25	Concentración inicial de nitratos x0.10
Velocidad específica máxima de crecimiento celular (días ⁻¹)	μ_{max}	t < 3, 10, 17 y t > 20	1.0842	0.6119	0.5622	0.4718
Constante de afinidad al sustrato (g NO ₃ /mL)	Ks	t < 3, 10, 17 y t > 20	2.1015×10 ⁻⁴	1.6005×10 ⁻⁵	1.2009×10 ⁻⁵	2.0014×10 ⁻⁶

Parámetro	Simbología	Rango de tiempo (días)	Concentración inicial de nitratos x1.00	Concentración inicial de nitratos x0.50	Concentración inicial de nitratos x0.25	Concentración inicial de nitratos x0.10
Rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la fase lag (células/g NO ₃)	Y _{X1}	t < 3	9.0016×10 ⁹	9.0631×10 ⁹	2.9905×10 ¹⁰	1.9903×10 ¹⁰
Rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la parte 1 de la fase exponencial (células/g NO ₃)	Y _{X2}	t > 6 y t < 10	1.6035×10 ¹⁰	3.2591×10 ¹⁰	2.6057×10 ¹⁰	7.0154×10 ¹⁰
Rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la parte 2 de la fase exponencial (células/g NO ₃)	Y _{X3}	t > 13 y t < 17	3.0066×10 ¹⁰	5.0779×10 ¹⁰	8.4185×10 ¹⁰	1.7037×10 ¹¹

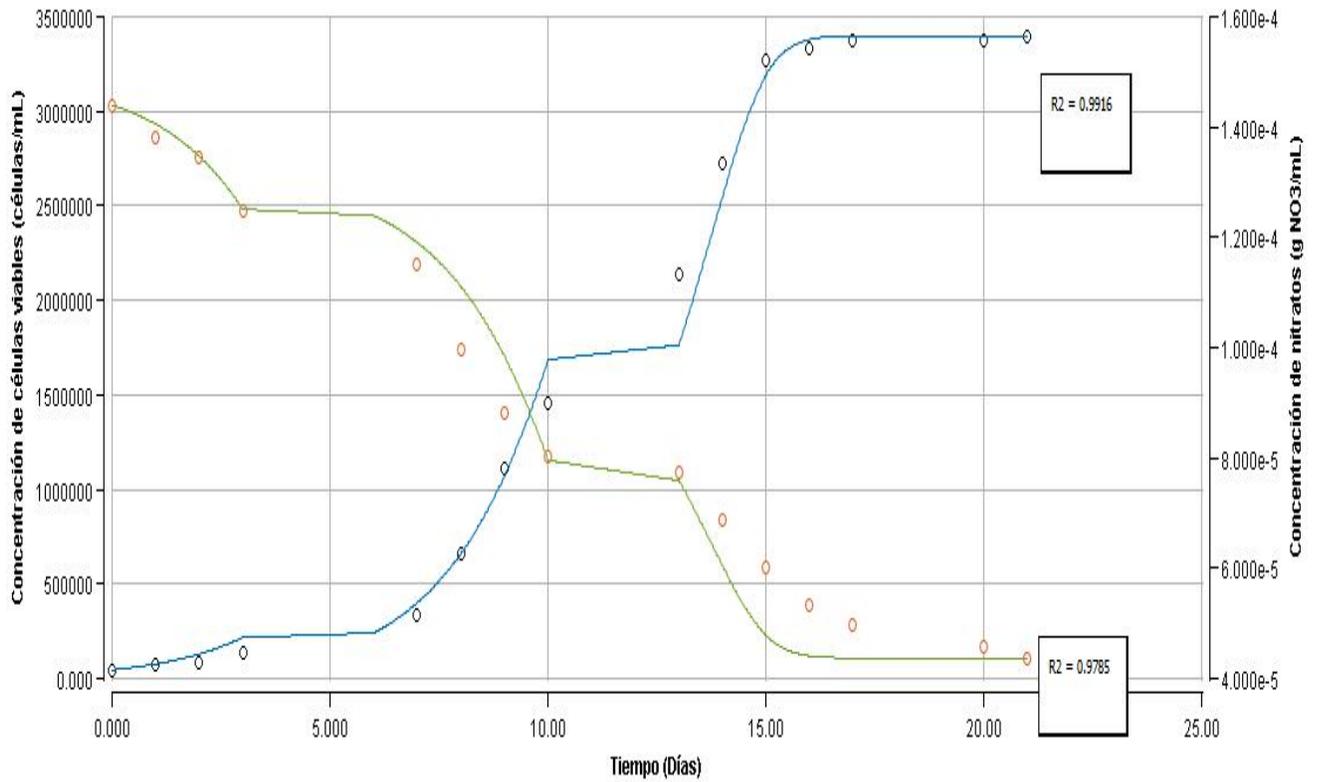
Parámetro	Simbología	Rango de tiempo (días)	Concentración inicial de nitratos x1.00	Concentración inicial de nitratos x0.50	Concentración inicial de nitratos x0.25	Concentración inicial de nitratos x0.10
Rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la fase estacionaria (células/g NO ₃)	Y _{X4}	t > 20	1.1302×10 ¹⁰	1.1304×10 ¹⁰	1.1302×10 ¹⁰	1.1302×10 ¹⁰
Velocidad específica máxima de crecimiento celular para los días en fin de semana (días ⁻¹)	μ _{maxf}	t < 6, 13, 20	7.8401×10 ¹²	7.8404×10 ¹²	7.8401×10 ¹²	7.8401×10 ¹²
Constante de afinidad al sustrato para los días en fin de semana (g NO ₃ /mL)	K _{Sf}	t < 6, 13, 20	1.8002×10 ¹⁰	1.8001×10 ¹⁰	1.8001×10 ¹⁰	1.8002×10 ¹⁰
Rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para el fin de semana (células/g NO ₃)	Y _{Xf}	t < 6, 13, 20	2.1046×10 ¹⁰	2.1040×10 ¹⁰	2.1046×10 ¹⁰	2.1046×10 ¹⁰

Figura 22. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga *N. oculata* y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de 1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L



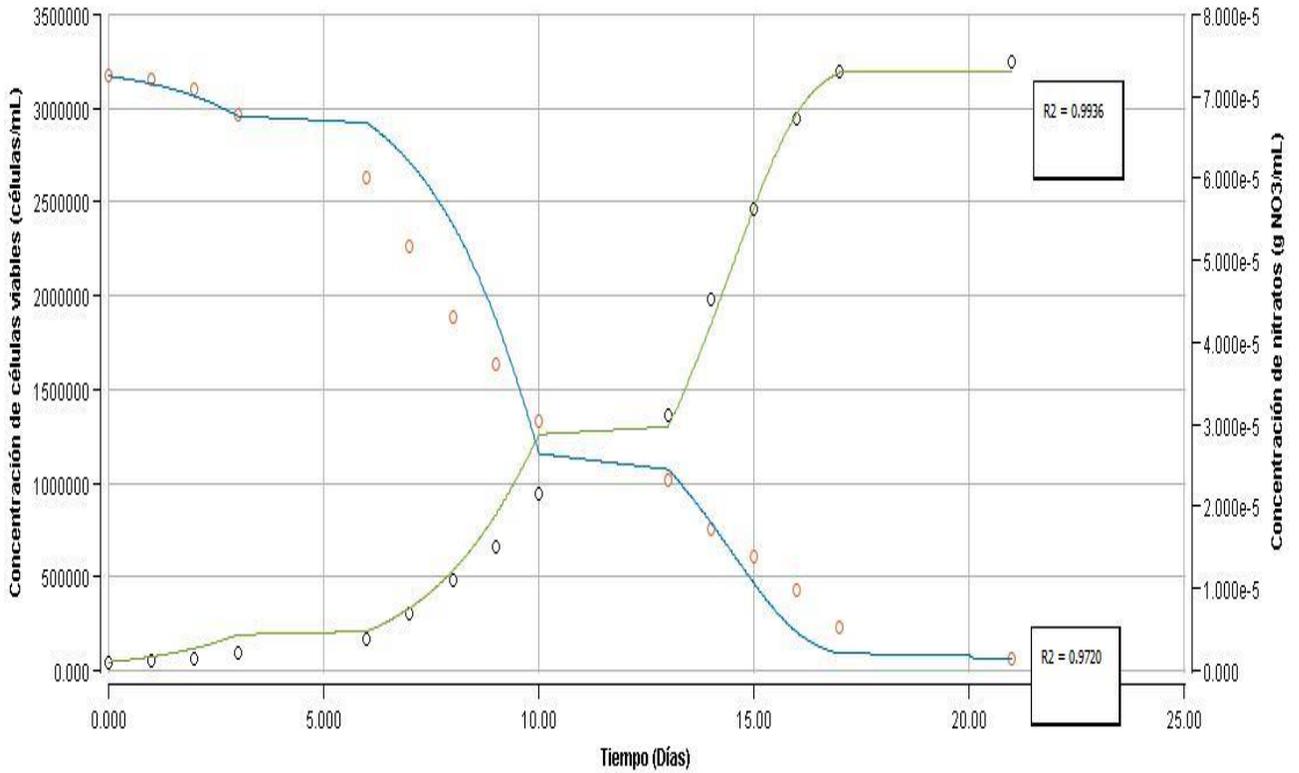
Código de colores: curva azul – ajuste matemático de la concentración celular obtenido con el Software Berkley Madonna®, curva verde - ajuste matemático de la concentración de nitratos obtenido con el Software Berkley Madonna®, puntos naranjas – datos experimentales de la concentración celular obtenidos a partir del MUSE®, puntos negros – datos experimentales de la concentración de nitratos obtenidos a partir del HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 48.

Figura 23. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga *N. oculata* y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de $x0.50$ en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L



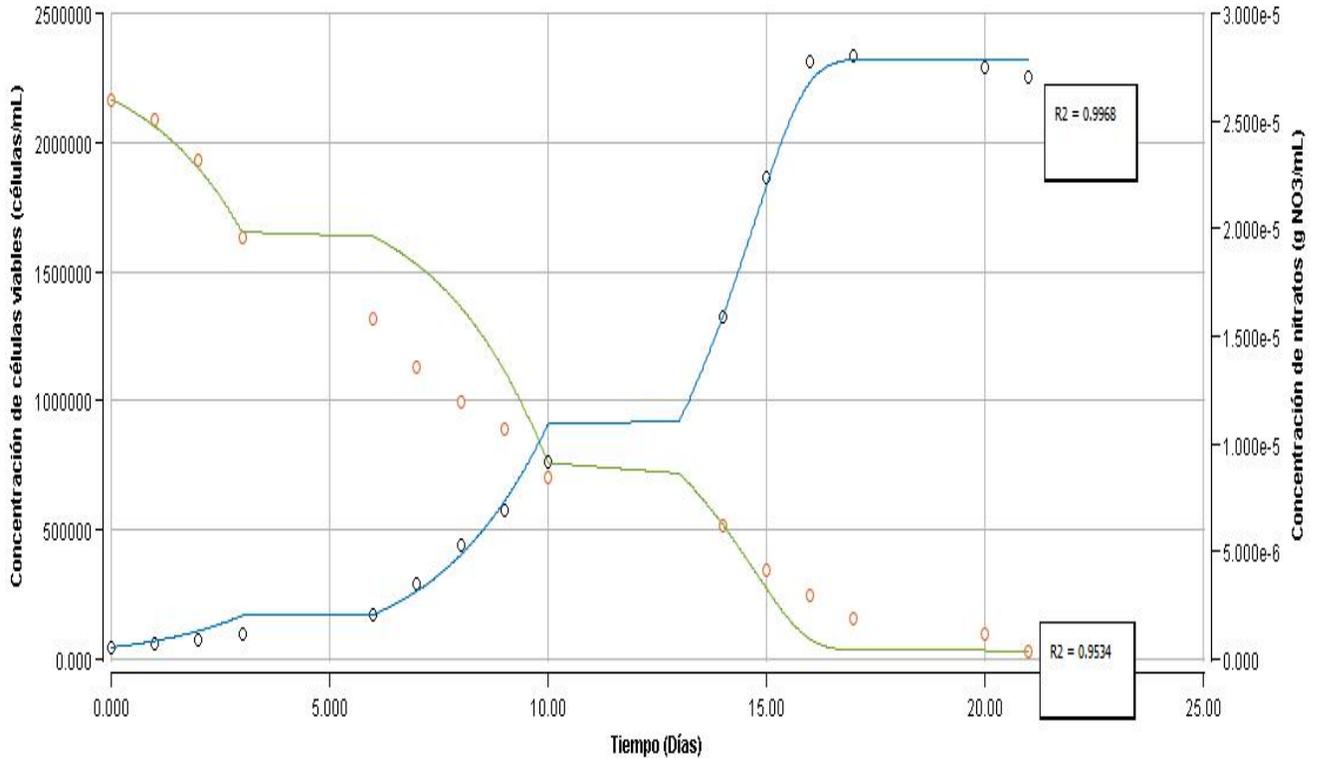
Código de colores: curva azul – ajuste matemático de la concentración celular obtenido con el Software Berkley Madonna®, curva verde - ajuste matemático de la concentración de nitratos obtenido con el Software Berkley Madonna®, puntos naranjas – datos experimentales de la concentración celular obtenidos a partir del MUSE®, puntos negros – datos experimentales de la concentración de nitratos obtenidos a partir del HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 53.

Figura 24. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga *N. oculata* y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L



Código de colores: curva verde – ajuste matemático de la concentración celular obtenido con el Software Berkley Madonna®, curva azul - ajuste matemático de la concentración de nitratos obtenido con el Software Berkley Madonna®, puntos naranjas – datos experimentales de la concentración celular obtenidos a partir del MUSE®, puntos negros – datos experimentales de la concentración de nitratos obtenidos a partir del HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 58.

Figura 25. Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga *N. oculata* y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de $x0.10$ en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L



Código de colores: curva azul – ajuste matemático de la concentración celular obtenido con el Software Berkley Madonna®, curva verde - ajuste matemático de la concentración de nitratos obtenido con el Software Berkley Madonna®, puntos naranjas – datos experimentales de la concentración celular obtenidos a partir del MUSE®, puntos negros – datos experimentales de la concentración de nitratos obtenidos a partir del HACH DR 890. Los datos utilizados para construir la gráfica se encuentran en el Cuadro 63.

Cuadro 5. Porcentaje de lisis celular promedio de las microalgas *N. oculata* tratadas bajo distintos métodos de lisis celular

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular previo al tratamiento (± 0.1528 %)	Viabilidad celular	
			posterior al tratamiento (células viables/células totales %)	Porcentaje de lisis celular (%)
Estrés mecánico con licuadora	5	71.400	69.330 \pm 0.640	2.89 \pm 0.90
Estrés mecánico con licuadora	10	71.400	64.300 \pm 0.980	9.94 \pm 1.38
Estrés mecánico con licuadora	15	71.400	62.430 \pm 0.640	12.56 \pm 0.90
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	5	71.400	70.670 \pm 0.210	1.03 \pm 0.29
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	10	71.400	70.300 \pm 0.100	1.54 \pm 0.14
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	15	71.400	69.870 \pm 0.060	2.15 \pm 0.08
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	5	71.400	70.300 \pm 0.200	1.54 \pm 0.28
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	10	71.400	69.570 \pm 0.150	2.57 \pm 0.21
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	15	71.400	66.910 \pm 0.360	6.30 \pm 0.50
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	5	71.400	71.000 \pm 0.170	0.56 \pm 0.24

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular previo al tratamiento (± 0.1528 %)	Viabilidad celular	
			posterior al tratamiento (células viables/células totales %)	Porcentaje de lisis celular (%)
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	10	71.400	69.830 \pm 0.830	2.19 \pm 1.17
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	15	71.400	68.630 \pm 1.51	3.87 \pm 2.12
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	7.5/7.5	71.700	64.330 \pm 1.50	10.27 \pm 2.09
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	15/15	71.700	62.370 \pm 0.90	13.02 \pm 1.26

Experimentación realizada a temperatura de 25°C con el mismo cultivo de microalgas obtenidas en un medio con una concentración de 0.3 g de NaNO₃/L.

Cuadro 6. Porcentaje promedio de recuperación de aceite vegetal utilizando distintos métodos de extracción con solventes

Método de solventes	Aceite vegetal inicial (± 0.0677 g)	Aceite vegetal recuperado (± 0.0868 g)	Porcentaje de recuperación (± 2.2274 %)
Cloroformo:metanol (2:1)	2.5426	2.2860	89.4612
Cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)	2.5036	2.1174	84.5762
Etanol:hexano (1:1)	2.5347	2.0303	80.1023

Experimentación realizada a temperatura de 25 °C, medio con 2.5 g de biomasa seca de microalgas cultivadas en un tanque de laguna abierta en la Universidad del Valle de Guatemala, agitación a 5000 rpm por 15 minutos y extracción por 24 horas en ampolla de decantación.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la presente investigación se tomó en triplicado una muestra de las microalgas presentes en el reactor abierto tipo laguna de la Universidad del Valle de Guatemala. Estas fueron analizadas en el microscopio, con ayuda de una cámara de Neubauer, para analizar su morfología y hacer un recuento de las microalgas *Nannochloropsis oculata*. Se obtuvo que en todas las muestras (ver Figura 26 y Figura 44) el 100% de las células que lograron apreciarse cuentan con una morfología circular de tamaño pequeño y eran de color verde, las cuales son características esperadas de las microalgas *N. oculata* (Guiry, 2013). Por lo tanto, se infirió que el mayor porcentaje de microorganismos presentes en las muestras del reactor abierto tipo laguna corresponden a las microalgas *N. oculata*, por lo que fueron utilizadas para hacer el inóculo de las fermentaciones realizadas en la presente investigación.

Cabe resaltar que, para asegurar que los microorganismos que crecieron en las fermentaciones fueron solo las microalgas *N. oculata*, se utilizó el medio f/2 Guillard comercial para hacer crecer el inóculo inicial. Este, al ser un medio selectivo para microalgas marinas y contar con todos los nutrientes en las concentraciones ideales para su crecimiento, permite asegurar con un alto porcentaje de confianza (95%) que solo microalgas *N. oculata* crecerán en el inóculo y, por ende, se puede asegurar que crecerán a las nuevas condiciones a las que serán sometidas (Guillard, 1975). Posteriormente, se utilizó el medio f/2 Guillard modificado, con el fin de poder agregar las concentraciones deseadas de la fuente de nitrógeno a cada fermentación. Además, se optó por realizar dicho medio en el laboratorio debido a los costos que hubiese representado utilizar el medio comercial.

Por último, cabe agregar que, para asegurar que solo las microalgas *N. oculata* crecieron en la fermentación inicial (utilizada posteriormente como inóculo para las demás fermentaciones), así como en las demás fermentaciones, se empleó el microscopio para analizar nuevamente las células presentes en las muestras tomadas al final de cada fermentación. Se obtuvo en todos los casos que el 100% de las células presentes contaban con las características morfológicas esperadas para las microalgas *N. oculata* (ver Figura 44). Por lo tanto, al provenir las células de un inóculo con medio f/2 Guillard comercial, se asegura con un 95% de confianza que en las fermentaciones se cultivó solo microalgas *N. oculata*. A pesar de esto, se recomienda hacer un análisis metagenómico de la microbiota presente en el reactor abierto tipo laguna de la Universidad Del Valle de Guatemala, para asegurar con un 100% de confianza qué especie de microalga es la que se encuentra presente en dicho reactor.

Crecimiento de microalgas a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Con el fin de determinar cuál es la concentración inicial de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de las microalgas *N. oculata* que permite obtener una mayor producción de lípidos, se evaluaron 4 concentraciones iniciales: x1.00 (0.300 g NaNO₃/L), x0.50 (0.150 g NaNO₃/L), x0.25 (0.075 g NaNO₃/L) y x0.10 (0.030 g NaNO₃/L). Cabe resaltar que se definió la concentración x1.00 como la prueba de control positiva, puesto que en la literatura se reporta esta concentración inicial de la fuente de nitrógeno como la ideal para que las microalgas *N. oculata* crezcan adecuadamente (Guillard, 1975). Se definió variar solo la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de dichas microalgas puesto que en la literatura se reporta que este nutriente, cuando se encuentra en bajas concentraciones, induce una mayor síntesis y acumulación de lípidos dentro de las microalgas (Hu, 2004). Es importante recalcar que en todas las fermentaciones se monitoreo las variables de pH, temperatura, salinidad, flujo de aireación, tiempo de iluminación e intensidad lumínica, para que se mantuviesen constantes y así evaluar exclusivamente el efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de las microalgas *N. oculata* y la posible producción de lípidos.

En primer lugar, es importante recalcar el balance de masa que puede realizarse en una sola célula de las microalgas *N. oculata*. A la célula ingresarán todos los nutrientes del medio de cultivo, incluyendo el sustrato limitante: nitrato. Además, requerirá de dióxido de carbono, agua y luz para llevar a cabo la fotosíntesis. Como resultado de todas las reacciones bioquímicas que conforman el metabolismo celular de las microalgas, se obtendrá una mayor cantidad de biomasa, es decir, la célula podrá reproducirse, dando como resultado más células. Además, dichas células podrán aumentar su tamaño y se habrá producido oxígeno, carbohidratos, distintos metabolitos secundarios y otras moléculas, como los lípidos, como reserva de energía en el interior celular (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Cuando las microalgas se encuentren en un medio con privación de nitrógeno entrarán en estrés, que tal y como se mencionó anteriormente, provocará un cambio en el metabolismo celular de las microalgas. Este cambio inducirá a que disminuya la tasa a la que se sintetizan las proteínas estructurales y aumente la tasa de síntesis de lípidos dentro de las células, ya que estas moléculas se utilizarán como reserva de energía ante condiciones ambientales de estrés (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Por lo tanto, el balance de masa por célula se verá afectado ante la privación de nitrógeno. Las células seguirán recibiendo el dióxido de carbono, el agua, la luz y los nutrientes del medio, pero una menor concentración de nitrato como fuente de nitrógeno. Por ende, las células al tener menor producción de proteínas, pero mayor producción de lípidos, se obtendrá menor

cantidad de biomasa, pero las células que conformen dicha biomasa estarán más llenas de lípidos. En síntesis, bajo privación de nitrógeno, la relación lípidos/biomasa de las microalgas aumentará. Pero en condiciones con las concentraciones adecuadas de nitrato como fuente de nitrógeno, las células seguirán sintetizando a la misma tasa las proteínas estructurales, pero a menor tasa los lípidos como reserva de energía, por lo que se obtendrán células con una menor relación lípidos/biomasa.

Gracias a este principio, se puede analizar la concentración ideal de la fuente de nitrógeno que permite obtener una buena producción de lípidos dentro de las microalgas, de tal forma que se obtenga la mejor relación lípidos/biomasa. Cabe resaltar que encontrar esta concentración ideal de la fuente de nitrógeno puede favorecer a que en futuras investigaciones, si se desea producir cierta cantidad de lípidos, esto pueda lograrse en un medio de cultivo en el que no sea necesario agregar más nutrientes de los que las microalgas van a necesitar para alcanzar el objetivo. Permitiendo así disminuir los costos para realizar las fermentaciones.

Al comparar el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su consumo de nitratos en las distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno (ver Figura 16, Figura 17, Figura 18 y Figura 19), se observa que a una concentración inicial x1.00 y x0.50 el consumo de nitratos no es tan pronunciado y no llega a una concentración final de 0.00 g NO₃/L a los 21 días. En cambio, a una concentración inicial de x0.25 y x0.10 el consumo de nitratos se vuelve más pronunciado, en especial a la concentración inicial x0.10, donde el decaimiento de la concentración de nitratos comienza desde el primer día de experimentación. Además, bajo estas dos últimas concentraciones de la fuente de nitrógeno, se observa que se llega a una concentración final de 0.00 g NO₃/L a los 17 y 20 días, respectivamente.

Dicho comportamiento observado en las cuatro gráficas indicaría que a las concentraciones iniciales x1.00 y x0.50, el nitrógeno en forma de nitrato, no se encuentra a concentraciones limitantes. Es decir, el nitrato estaría en exceso, puesto que el crecimiento celular de las microalgas llega a la fase estacionaria sin que la concentración de este nutriente se agote por completo (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009). En cambio, a las concentraciones iniciales x0.25 y x0.10 el nitrato si estaría a concentraciones limitantes, puesto que las microalgas llegan a la fase estacionaria de su crecimiento celular conforme este nutriente se agota por completo. Por ende, el decaimiento más pronunciado de la concentración de nitrato a estas últimas concentraciones iniciales, en especial a la concentración inicial x0.10, se debe a que las microalgas aprovechan desde el inicio de la fermentación este nutriente, puesto que se encuentra en concentraciones limitantes (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009).

Por otro lado, al analizar el Cuadro 1, se puede comparar la duración de cada fase del crecimiento celular de las microalgas bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno. Se obtuvo que a cualquier concentración inicial de la fuente de nitrógeno, la fase lag dura 2 días. Esto indica que las microalgas requirieron poco tiempo para adaptarse al medio, sintetizar las moléculas necesarias para su metabolismo y crecimiento y comenzar a reproducirse (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009). Esto puede deberse a que el inóculo inicial de las microalgas que se utilizó para todas las fermentaciones provenía de un cultivo que se realizó bajo las mismas condiciones experimentales. Es decir, en el mismo fotobiorreactor, bajo las mismas variables constante y a la concentración inicial ideal de la fuente de nitrógeno: 0.300 g NaNO₃/L (x1.00).

Asimismo, se obtuvo que la fase de aceleración duró 4 días para todas las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, excepto para la concentración x0.50, la cual duró 5 días. Se considera que la duración de esta fase fue más larga de la esperada, puesto que en ese momento, teóricamente la tasa de división celular de las microalgas incrementa rápidamente hasta alcanzar un punto máximo, donde daría inicio la fase exponencial (Lee, 2009). Sin embargo, la extensa duración puede deberse a que en todas las fermentaciones se dejó de tomar continuamente muestras, para determinar la concentración celular y la concentración de nitratos, después del día 3. Por ende, no se obtuvo datos experimentales para determinar con certeza la duración de esta fase y se debió realizar estimaciones con los datos recabados y el comportamiento obtenido del crecimiento celular de las microalgas.

Se obtuvo que la fase exponencial duró diferente para cada concentración inicial de la fuente de nitrógeno analizada, siendo la concentración x0.25 la que duró más tiempo: 10 días, y la concentración x0.50 la que duró menos tiempo: 6 días. Sin embargo, es importante resaltar que, debido a que para esta experimentación se dejó de tomar muestras a los 3 días de fermentación y se retomó hasta el día 7, y no al día 6 como las demás fermentaciones, se desconoce también el momento exacto que dura la fase exponencial. Por eso, se infiere que esta fase pudo durar al menos un día más, es decir 7 días, por el lapso de tiempo mayor en el que se dejó de muestrear.

Independientemente de esto, se esperaba que la fase exponencial durara más en las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno x1.00 y x0.50, puesto que, como se discutió anteriormente, al haber un exceso de nitrógeno en forma de nitrato, las microalgas tendrían mayor disponibilidad de este nutriente para sintetizar moléculas necesarias para su metabolismo y reproducción (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Sin embargo, no fue el caso, por lo que se infiere que otro nutriente, como el fósforo, pudo actuar como sustrato limitante e influir en el crecimiento

celular de las microalgas. También se pudo haber generado más productos de desecho celular que se acumularon en el medio e inhibieron el crecimiento celular. O, por otro lado, la densidad celular en el medio pudo ser muy grande que no permitía que la luz llegará a todo el medio de forma homogénea, ya que las lámparas se encontraban en el exterior de los reactores e iluminaban de forma directa solo un lado de los reactores, provocando así una menor tasa de fotosíntesis, y, todo esto en conjunto, podría explicar la diferencia en la duración de la fase exponencial entre las condiciones analizadas y la razón por la cual no se logró una mayor densidad celular al final de las fermentaciones (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009; Audesirk *et al.*, 2012). De la misma forma, a las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno $\times 0.25$ y $\times 0.10$, como se infiere que el nitrógeno en forma de nitrato si actuó como sustrato limitante, la duración de la fase exponencial fue mayor para la concentración $\times 0.25$ pues había mayor disponibilidad del nutriente para la síntesis de moléculas necesarias para las células y para su reproducción (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Se obtuvo que la fase de desaceleración duró 2 días para las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno $\times 1.00$ y $\times 0.50$ y duró 1 día para las concentraciones $\times 0.25$ y $\times 0.10$. La diferencia en la duración de las fases puede deberse a la influencia de los diferentes sustratos limitantes, tal y como se discutió anteriormente. Asimismo, se considera que no se determinó con exactitud la duración de esta fase para cada fermentación, debido a los días que se dejó de muestrear, tal y como se menciona anteriormente. Por lo tanto, la diferencia en la duración de las fases también podría explicarse por esto.

Por último, se obtuvo que la fase estacionaria para las concentraciones iniciales de nitrógeno $\times 1.00$ y $\times 0.25$ dura 4 días y para las concentraciones $\times 0.50$ y $\times 0.10$ dura 6 días. Cabe resaltar que la duración de dicha fase tampoco se determinó con exactitud para cada fermentación debido a que no se muestreó diariamente. Además, se estima que esta fase puede durar más, pero las fermentaciones se detuvieron a los 21 días, por lo que no se pudo determinar en esta investigación. Asimismo, se infiere que la duración reportada de esta fase depende de la duración de la fase exponencial, puesto que, mientras más dure la fase exponencial, se puede monitorear por menos tiempo la fase estacionaria en los 21 días de fermentación. Esto se confirma al observar que justamente a las concentraciones $\times 1.00$ y $\times 0.25$ se reportan las duraciones más largas de la fase exponencial, pero las más cortas de la fase estacionaria. Esto indicaría nuevamente que a las concentraciones $\times 1.00$ y $\times 0.25$ había más disponibilidad de nutrientes, por lo que la fase exponencial duró más.

Por otra parte, se infiere que, de haber logrado inducir que las microalgas sintetizaran lípidos bajo las condiciones experimentales analizadas, en las concentraciones iniciales de

nitrógeno x0.50 y x0.10 se tuvo que haber sintetizado una mayor concentración, puesto que a dichas condiciones se logró una fase estacionaria más larga en el tiempo de fermentación de 21 días, por lo que las microalgas tuvieron más tiempo para sintetizar más lípidos, los cuales se sintetizan más en dicha fase. Sin embargo, considerando que a la concentración inicial de nitrógeno de x0.10 si hubo una privación de nitrógeno en forma de nitrato, las condiciones pudieron haber provocado estrés en las microalgas e inducido que cambiaran su metabolismo para dejar de sintetizar proteínas y sintetizar más lípidos como reserva de energía. Por lo que a esta última concentración se esperaría obtener un mayor rendimiento de lípidos por biomasa producida en comparación a la demás concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Al analizar ahora la Figura 20, se puede comparar fácilmente el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* bajo las distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno que se analizaron. Primero, es importante mencionar que solamente la concentración inicial x1.00 fue analizada en triplicado. Por lo que la variabilidad obtenida de dicho triplicado fue aplicada a los datos experimentales obtenidos con las demás concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno que solo se analizaron en duplicado. Esto con el fin de realizar un mejor análisis estadístico entre las condiciones experimentadas. La variabilidad de la concentración celular para cada medición se obtuvo calculando el porcentaje que representa la desviación estándar de los datos del triplicado respecto a la media y multiplicando por 3 este resultado, con el fin de obtener un porcentaje de desviación que se encontrase dentro de 3 desviaciones estándar respecto a la media. Con esto, al aplicarlo a los demás datos experimentales, se puede afirmar que se tiene un 99.7% de confianza en el análisis estadístico (Anderson, Sweeney & Williams, 2015). Cabe resaltar que se obtuvo un promedio de dicho porcentaje de desviación para cada fase del crecimiento celular y finalmente los promedios obtenidos fueron aplicados a cada fase del crecimiento celular obtenido bajo las distintas concentraciones iniciales de nitrógeno.

Con dicho análisis estadístico se pudo graficar la variación del crecimiento celular para cada condición experimentada, como se observa en la Figura 20. Se obtuvo que bajo todas las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno la concentración celular es casi igual en los primeros 2 días de fermentación. Lo cual se explica por la fase lag del inóculo utilizado, el cual fue el mismo para todas condiciones, tal y como se discutió anteriormente. Luego, se observa que las concentraciones celulares a una concentración inicial de nitrógeno x1.00 y x0.50 se traslapan hasta el día 16, donde la concentración celular a la concentración inicial de nitrógeno x1.00 está en desaceleración y la concentración celular a la concentración inicial de nitrógeno x0.50 ya se encuentra en fase estacionaria. Esto puede deberse a que, gracias a que a la concentración inicial

de nitrógeno x1.00 hay más disponibilidad de este nutriente en forma de nitrato, las microalgas pueden seguir sintetizando más proteínas estructurales, entre otras moléculas importantes para el metabolismo, por lo que se pueden seguir reproduciendo, alcanzando así al final de la fermentación de 21 días una mayor concentración celular $[(4.15 \pm 0.26) \times 10^6]$ células viables/mL que en comparación a las microalgas que crecen bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50 $[(3.36 \pm 0.21) \times 10^6]$ células viables/mL e incluso que las concentraciones x0.25 $[(3.53 \pm 0.22) \times 10^6]$ células viables/mL y x0.10 $[(2.23 \pm 0.14) \times 10^6]$ células viables/mL (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Este mismo comportamiento se observa entre las concentraciones celulares a una concentración inicial de nitrógeno de x0.25 y x0.10. Las concentraciones celulares se traslapan, pero la concentración celular a la concentración inicial de nitrógeno x0.25 es siempre mayor, hasta el día 15, donde la concentración celular a la concentración inicial de nitrógeno x0.10 ya está en fase estacionaria y la concentración celular a la concentración inicial de nitrógeno x0.25 aún se encuentra en fase exponencial. Por lo tanto, se logra una mayor concentración celular a la concentración inicial de nitrógeno de x0.25, lo cual también se explica por la mayor disponibilidad del nitrógeno en forma de nitrato, tal y como se discutió anteriormente.

Además, se puede observar que, a pesar de que las concentraciones celulares a una concentración inicial de nitrógeno x0.50 y x0.25 no se traslapan durante la fase de aceleración y la fase exponencial, si se traslapan durante la fase estacionaria, reportándose incluso una mayor concentración celular bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25. Sin embargo, debido a las variaciones en las mediciones, no hay significancia estadística para inferir que bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 se puede obtener una mayor concentración celular que bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50.

Este comportamiento puede deberse a que bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 las microalgas aprovecharon después de la fase lag de mejor manera el nitrógeno en forma de nitrato para sintetizar proteínas estructurales y otras moléculas indispensables para su metabolismo y reproducción, por lo que bajo estas condiciones si se logró una mayor concentración celular hasta el día 15 de fermentación. Por ende, a mayor concentración celular se infiere que el nitrato se consumió más rápido, alcanzando así la fase de desaceleración y la fase estacionaria antes que las microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25. Sin embargo, como a esta última concentración hubo menor concentración celular hasta el día 15, aún tuvo que haber concentración de nitrato suficiente para que la fase exponencial durase más y así alcanzar incluso

en la fase estacionaria la misma concentración celular que la que se obtuvo en la fase estacionaria de las microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50.

Cabe agregar que la variabilidad obtenida de la experimentación en triplicado al medir la concentración de nitrato en el tiempo fue aplicada a los datos experimentales obtenidos con las demás concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno que solo se analizaron en duplicado. El procedimiento empleado fue el mismo que se discutió anteriormente para la concentración celular. Por ende, al analizar la Figura 21 se puede observar el decaimiento de la concentración de nitrato para cada concentración inicial de la fuente de nitrógeno, con su respectiva variabilidad. Se observa que ninguna curva de consumo de sustrato se traslapa en el tiempo, exceptuando las curvas de consumo de sustrato a las concentraciones inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25 y x0.10 que se traslapan cuando la concentración de nitrato se agota por completo. Por ende, se infiere que cada consumo de sustrato en el tiempo es representativo exclusivamente para cada concentración inicial de la fuente de nitrógeno.

Al analizar los resultados que se exponen el Cuadro 2 se obtuvo que las microalgas tuvieron un tiempo de generación más grande cuando crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00, siendo este de 3.03 ± 0.64 días, y tuvieron un tiempo de generación más pequeño cuando crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50, siendo este de 2.70 ± 0.64 días. Se esperaba que conforme aumentara la concentración inicial de la fuente de nitrógeno también aumentara la concentración celular debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno en forma de nitrato, tal y como se discutió anteriormente. Por ende, también se esperaba que aumentase el tiempo de generación, puesto que al haber mayor concentración celular, a las células les tomará más tiempo lograr reproducirse hasta producir una nueva generación, es decir, hasta duplicarse (Lee, 2009). Sin embargo, el tiempo de generación para las microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 y x0.10, el cual fue de 2.76 ± 0.64 días y 2.72 ± 0.64 días, respectivamente, fue mayor que el tiempo de generación de las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50.

Esto indicaría que bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 las microalgas aprovecharon mejor los nutrientes del medio y se reprodujeron más rápido, en especial en la fase exponencial, en comparación a las microalgas que crecieron bajo las otras condiciones analizadas, por lo que su tiempo de generación fue el más pequeño. Esto tiene sentido, puesto que las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 presentaron una curva del crecimiento celular con la fase exponencial más corta (6 días), sin embargo, lograron producir una concentración celular de $(3.36 \pm 0.21) \times 10^6$ células viables/mL,

muy cercana a la concentración celular de las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25, la cual fue de $(3.53 \pm 0.22) \times 10^6$ células viables/mL, y que presentaron una curva del crecimiento celular con la fase exponencial más larga (10 días). Por ende, las microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 se duplicaron más rápido, a pesar de tener la fase exponencial más corta, para lograr la concentración celular de $(3.36 \pm 0.21) \times 10^6$ células viables/mL.

A pesar de esto, se observa que realmente el tiempo de generación de las microalgas que crecieron bajo las distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno muy similares entre sí. Además, con el error asociado al cálculo del tiempo de generación (± 0.64 días) se obtiene que no habría diferencia estadística entre todos los tiempos de generación obtenidos. Sin embargo, la diferencia entre estos tiempos también puede estar originada por la variación en la concentración inicial de la fuente de nitrógeno y por otras condiciones ambientales bajo las que se sometieron las microalgas. Por ejemplo, podría deberse a las pequeñas variaciones que hubo en los sistemas, como fluctuaciones en el flujo de aire, en la temperatura o en el pH, los cuales pueden desfavorecer el crecimiento celular de las microalgas si no se encuentran en los rangos óptimos establecidos al inicio de la fermentación.

Por otra parte, se obtuvo que mientras más grande sea la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, mayor productividad de células se obtendrá (ver Cuadro 2). Las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 lograron una productividad de $(2.46 \pm 0.26) \times 10^8$ células/L día, siendo esta la mayor productividad. En cambio, las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 lograron una productividad de $(1.59 \pm 0.17) \times 10^8$ células/L día, la cual fue la más baja obtenida. Esto se debe a que mientras mayor sea la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, mayor disponibilidad de nitrógeno en forma de nitrato habrá para que las células lo aprovechen en su metabolismo y reproducción, tal y como se discutió anteriormente. Por ende, se logra producir una mayor concentración celular al día mientras mayor disponibilidad inicial de nitrato hay en el medio de cultivo (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Por último, se obtuvo que conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, mayor rendimiento de células respecto al sustrato se obtiene (ver Cuadro 2). Las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 alcanzaron el mayor rendimiento, el cual fue de $(8.38 \pm 0.71) \times 10^{10}$ células/g NO₃. En cambio, las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 alcanzaron el menor rendimiento, el cual fue de $(1.95 \pm 0.21) \times 10^{10}$ células/g NO₃. Esto se debe a que cuando hay una

deprivación de la fuente de nitrógeno, las microalgas lo aprovechan lo mejor posible para reproducirse y sobrevivir. Incluso para sintetizar lípidos como reserva de energía, pero la generación de células se verá limitada por la escasez de nutrientes (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Si bien en este caso las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 no lograron la mayor concentración celular al final de la fermentación, la relación entre la concentración celular producida y el consumo de la baja concentración de sustrato a la que se sometieron, fue eficiente, reflejándose en el rendimiento de células respecto a sustrato. En cambio, las microalgas que crecieron bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00, si bien lograron la mayor concentración celular al final de la fermentación, consumieron más nitratos que las microalgas analizadas anteriormente, por lo que la relación entre la células producidas y el consumo del sustrato no fue el más eficiente, reflejándose en el rendimiento de células respecto a sustrato. Las microalgas bajo estas últimas condiciones, al tener un exceso de nitrógeno en forma de nitrato, también lo pudieron haber aprovechado para la síntesis de más metabolitos de interés que no están estrictamente relacionados con la reserva de energía, como proteínas y aminoácidos, incluso para aumentar su tamaño celular, lo cual explicaría el bajo rendimiento de células respecto al sustrato (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Como se puede observar en el Cuadro 3, se obtuvo que a mayor concentración inicial de la fuente de nitrógeno, mayor producción de biomasa de microalgas *N. oculata* se logra. Al cultivar las microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00 y emplear la centrifugación y posterior secado para recuperar la biomasa, como se describe en la metodología, se logró recuperar 12.5005 ± 0.0193 g de biomasa, siendo esta la mayor producción. En cambio, la menor producción de biomasa de microalgas se logró en el cultivo de microalgas que crecieron bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.10, ya que se logró recuperar 9.1464 ± 0.0193 g de biomasa. Esto se debe a que a una mayor concentración de la fuente de nitrógeno, las microalgas tendrán disponible en el medio de cultivo mayor concentración de nitrógeno en forma de nitrato, el cual aprovechan para sintetizar proteínas estructurales y aminoácidos, importantes para el metabolismo y reproducción. Por ende, a mayor concentración de nitrógeno, las células se reproducen más y logran alcanzar una mayor concentración celular al final de la fermentación, lo cual se traduce en una mayor producción de biomasa (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Por el otro lado, se obtuvo que el rendimiento de biomasa respecto al sustrato limitante: nitrato, es mayor conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno (ver Cuadro 3). El mayor rendimiento de biomasa respecto al sustrato se obtuvo con las microalgas que

crecieron a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x0.10$, siendo este de 72.4731 ± 4.0988 g biomasa/g NO_3 . En cambio, el menor rendimiento de biomasa respecto al sustrato se obtuvo con las microalgas que crecieron a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x1.00$, siendo este de 11.9627 ± 1.0822 g biomasa/g NO_3 . Esto se debe al mismo principio discutido anteriormente para el rendimiento de células respecto al sustrato, en donde se recalca que, a menor concentración de la fuente de nitrógeno, las células aprovechan de mejor manera el sustrato para su metabolismo y reproducirse, con el fin de asegurar su sobrevivencia, produciendo así una buena concentración celular, que se traduce en mayor producción de biomasa por gramo de sustrato limitante (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). En cambio, a altas concentraciones de la fuente de nitrógeno, las células emplean más sustrato para su metabolismo y su producción, resultando en un uso ineficiente del sustrato limitante en relación con la producción de biomasa (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Por último, como se reporta en el Cuadro 3, bajo cualquier concentración inicial de la fuente de nitrógeno, no se logró recuperar el aceite que las microalgas pudieron haber producido bajo las condiciones experimentales analizadas. Se esperaba que bajo las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno $x0.25$ y $x0.10$ las microalgas cambiaran su metabolismo, para dejar de sintetizar proteínas a la misma tasa y sintetizaran más lípidos como reserva de energía, puesto que estarían sometidas a un estrés por deficiencia de nitrógeno. Por ende, se esperaba que a estas condiciones se produjese un mejor rendimiento de lípidos respecto a la biomasa producida, aunque es importante recalcar que estas condiciones también podrían resultar en una menor producción de biomasa debido a que no se sintetizan las proteínas estructurales suficientes para que las microalgas la inviertan en su reproducción (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Por el otro lado, se esperaba que bajo las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno $x1.00$ y $x0.50$ se produjese mayor biomasa, puesto que las microalgas tendrían mayor disponibilidad del nitrato para sintetizar más metabolitos importantes, como las proteínas estructurales, que contribuyen a una mayor reproducción celular. Además, al estar el nitrógeno en exceso, tal y como se discutió anteriormente, el metabolismo de las microalgas no estaría bajo estrés, por lo que no se verían obligadas a sintetizar más lípidos como reserva de energía. Por ende, a estas condiciones se esperaba que se produjese un menor rendimiento de lípidos respecto a la biomasa producida, aunque es probable que se produjese más aceite por la cantidad de biomasa producida, en comparación a las condiciones anteriormente discutidas (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

A pesar de esto, no se logró cuantificar el aceite que las microalgas pudieron haber producido bajo cualquiera de las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno. Al analizar mediante IR y en duplicado los líquidos recuperados de las destilaciones de los solventes utilizados para extraer los aceites, se obtuvo que los espectros de los líquidos que corresponden a la producción de microalgas bajo las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno de x0.50, x0.25 y x0.10 (ver Figura 41, Figura 42 y Figura 43) no coinciden con el espectro esperado de un aceite vegetal (ver Figura 39), lo cual confirma que se no logró extraer aceite de las microalgas bajo dichas condiciones. Es importante resaltar que tampoco hay evidencia para asegurar ni negar que bajo dichas condiciones de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno las microalgas *N. oculata* sintetizan lípidos.

Esto puede deberse a la metodología empleada para realizar la lisis celular y la empleada para recuperar el aceite de la biomasa producida. Si bien el método de lisis celular empleado (estrés mecánico inducido por licuadora por 15 minutos) en la biomasa producida en todas las fermentaciones genera el mayor porcentaje de lisis celular, tal y como se discutirá más adelante, se considera que resultó contraproducente para lograr la recuperación del aceite de las microalgas. Esto se afirma debido a que la lisis celular con licuadora provocó que la biomasa de las microalgas se fragmentara en partículas muy finas, lo cual pudo haber favorecido para que las partículas actuaran como surfactantes, logrando así una compatibilización entre la fase polar y apolar de la mezcla de solventes posteriormente utilizados para la extracción del aceite. Por ende, es posible que los lípidos no migrasen por completo de la fase acuosa a la fase orgánica, resultando así en que no se lograra extraer adecuadamente los aceites de las microalgas en el momento de destilar la fase orgánica (Manikantan & Squires, 2020; Cavonius, Carlsson & Undeland, 2014).

Debido a esto se recomienda evaluar primero si las microalgas han producido aceite al final de la fermentación, con el fin de poder asegurar que las condiciones evaluadas si favorecen a la síntesis de lípidos. Se ha reportado que metodologías como la espectroscopia de fluorescencia se utiliza para cuantificar el contenido lipídico de las microalgas (Chiu *et al.*, 2009). Asimismo, se recomienda evaluar otro método de lisis celular, que no interfiera con el método de extracción de aceite con solventes, para evitar la formación de partículas surfactantes. Por ejemplo, se puede evaluar si el método de lisis celular por ultrasonido no genera dichas partículas y utilizarlo en combinación al mismo método de extracción con solventes empleado en la presente experimentación, el cual fue cloroformo:metanol (2:1), o combinarlo con otro método de solventes como el etanol:hexano (1:1) (Hanupurti & Kristiawan, 2014).

Sin embargo, es importante recalcar que el duplicado del espectro IR del líquido obtenido de la destilación de los solventes utilizados para extraer los aceites de las microalgas producidas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00, si presentó picos de absorbancia esperados para la presencia de aceite vegetal. Como se puede observar en la Figura 40, se obtuvo un pico de absorbancia a 1743 cm^{-1} , cerca de los 1735 cm^{-1} , el cual es característico del grupo carbonilo presente en los ésteres de los ácidos grasos (Wade, 2017). Asimismo, se obtuvo un doble pico de absorbancia entre los 2854 y 2923 cm^{-1} , en el rango de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, lo cual corresponde al pico esperado de los enlaces carbono-hidrógeno presentes en los ácidos grasos (Wade, 2017). También se obtuvo un doble pico de absorbancia a 1159 cm^{-1} y a 1098 cm^{-1} , cercano al pico de absorbancia a los 1200 cm^{-1} que corresponde a los enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos y al pico de absorbancia a 1000 cm^{-1} que corresponde a los enlaces carbono-oxígeno presentes en los ácidos grasos, respectivamente (Wade, 2017).

Por lo tanto, se puede asegurar que el líquido recuperado de dicha destilación si contenía aceite producido por las microalgas y se podría asegurar que, a la concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00, las microalgas *N. oculata* si sintetizaron lípidos. Sin embargo, también se obtuvo picos de absorbancia no esperados para una muestra de aceite vegetal (ver Figura 40). Por ejemplo, se obtuvo un pico de absorbancia ancho a 3361 cm^{-1} , cercano a los 3300 cm^{-1} , el cual es característico para el enlace oxígeno-hidrógeno, el cual está presente en alcoholes como el metanol (CH_3OH) (Wade, 2017), el cual fue empleado como parte de la mezcla de solventes para extraer el aceite de las microalgas. Por lo tanto, se puede asegurar que este líquido analizado en IR, si bien contenía aceite de microalgas, aún estaba contaminado con metanol. Por lo tanto, no se logró cuantificar la cantidad exacta del aceite recuperado de las microalgas cultivadas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00.

En síntesis, con las microalgas cultivadas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 se logró obtener la mayor productividad de células [$(2.46 \pm 0.26) \times 10^8$ células/L día], la mayor producción de biomasa ($12.5005 \pm 0.0193\text{ g}$) y, a pesar de que no se logró cuantificar el aceite extraído de su biomasa, se confirmó mediante el análisis de IR de la extracción realizada que si produjeron aceite. Esto gracias a que la fuente de nitrógeno: nitrato, se encontraba en exceso, por lo que las células lo aprovecharon para reproducirse aún más, generando más biomasa, la cual también contiene aceite (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). A pesar de esto, con las microalgas cultivadas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 se logró obtener un mayor rendimiento global de células [$(8.38 \pm 0.71) \times 10^{10}$ células/g NO_3] y, por ende, un mayor rendimiento global de biomasa respecto al sustrato ($72.4731 \pm 4.0988\text{ g biomasa/g NO}_3$). Esto se debe a que las

microalgas, al estar privadas de nitrógeno, aprovechan exclusivamente este nutriente para la síntesis de moléculas esenciales, sintetizan lípidos como reserva de energía y, por ende, su reproducción se ve limitada. (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Cabe resaltar que, si bien se esperaba que las microalgas cultivadas bajo estas condiciones produjeran un mejor rendimiento global de aceite respecto a la biomasa, en comparación a las microalgas cultivadas a las otras condiciones, no se logró recuperar dicho aceite debido a interferencias en la metodología o a la baja producción de aceite bajo estas condiciones.

Modelo cinético que describe el crecimiento celular de las microalgas N. oculata a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Para generar un modelo cinético de la operación del fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L, con el fin de predecir el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, se analizó el ajuste matemático del modelo de Monod con los datos recabados experimentalmente de la concentración celular y la concentración de sustrato en el tiempo. Es importante mencionar que estos datos fueron suavizados previamente a su análisis en el software Berkeley Madonna con el fin de disminuir el ruido provocado por la metodología empleada para realizar las mediciones.

Por otro lado, cabe resaltar que se decidió utilizar el modelo de Monod debido a que este modelo simplifica lo complejo que es el crecimiento celular de las microalgas, como resultado de todas las reacciones bioquímicas que conforman el metabolismo celular (Lee, 2009). Además, se utiliza ampliamente para expresar el efecto que tiene la concentración del sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento específica (μ) (Lee, 2009), lo cual es de interés en la presente investigación, puesto que se desea determinar si la concentración inicial de la fuente de nitrógeno: nitrato, el sustrato limitante, tiene un efecto sobre el crecimiento celular y posible producción de lípidos. Por lo tanto, se asumió que la velocidad específica de crecimiento se ve influenciada únicamente por la concentración del sustrato limitante, por lo que se asumió que las variables de pH, salinidad, temperatura, flujo de aire, intensidad lumínica y los períodos de iluminación se mantuvieron constantes y no influenciaron a la velocidad específica de crecimiento. Asimismo, se asumió que las concentraciones de los posibles inhibidores del medio de cultivo son bajas, con el fin que el modelo describiera adecuadamente la cinética de la fermentación (Lee, 2009).

Cabe mencionar que al modelo de Monod solo se le hizo un pequeño ajuste (ver Ecuación 12), el cual consistió en restar el valor de la concentración del sustrato limitante al final de la

fermentación a la concentración del sustrato limitante que se expresa en la ecuación. Esto se llevó a cabo con el fin de que, al realizar el ajuste matemático del modelo Monod en el Software Berkeley Madonna, el valor del crecimiento celular específico en cada tiempo se viera afectado por el cambio en la concentración del sustrato limitante, ya que corresponde a la concentración de sustrato realmente utilizada por las microalgas *N. oculata* en cada tiempo analizado, y que dicha velocidad específica no se viera afectada únicamente por la concentración del sustrato limitante presente en ese tiempo de la fermentación. Esto con el fin de obtener un valor más exacto de la velocidad específica de crecimiento y que se adapte de mejor manera al crecimiento celular realmente ocurrido en el fotobiorreactor bajo las condiciones analizadas (Lee, 2009).

Por lo tanto, el modelo cinético de Monod modificado que describe la velocidad específica de crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* (Ecuación 12), junto con las ecuaciones que describen la velocidad del crecimiento celular (Ecuación 13), el cambio de la concentración celular de las microalgas *N. oculata* en el tiempo (Ecuación 15), la velocidad del consumo del sustrato limitante (Ecuación 14) y el cambio de la concentración del sustrato limitante (Ecuación 16), todas empleadas para las diferentes concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, fueron necesarias para realizar el ajuste matemático del modelo de Monod con los datos recabados experimentalmente, utilizando el Software Berkeley Madonna.

Con dicho ajuste, se obtuvo que en primera instancia el modelo no se ajustaba a los datos experimentales de ninguna de las fermentaciones a las distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno. Por ende, se procedió a analizar detenidamente en las gráficas generadas en Berkeley Madonna el comportamiento del crecimiento celular y el consumo de nitratos de las microalgas bajo las distintas condiciones experimentadas. Se encontró que para todas las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, el crecimiento celular presentaba comportamientos casi estacionarios durante la fase de aceleración y la fase exponencial, formando así una especie de escalones en las gráficas, lo cual no era esperado del crecimiento celular para dichas fases. De la misma forma, se encontró que el consumo de nitratos presentaba estas fases estacionarias, formando también una especie de escalones en las gráficas (ver Figura 22, Figura 23, Figura 24 y Figura 25). Cabe resaltar que la fase estacionaria no se vio afectada de la misma manera por dichos comportamientos, debido a que esta fase ya cuenta con un comportamiento estacionario.

Se encontró que dichos comportamientos estacionarios coincidían con los intervalos de tiempo en los que no se pudo muestrear la concentración celular ni la concentración de sustrato, debido a que la fermentación se encontraba en esos momentos en días de fin de semana y no se tuvo la posibilidad de analizar la experimentación de la misma forma en la que se realizó en los días

hábiles de la semana (lunes a viernes). Por lo tanto, se infiere que los “escalones estacionarios” se produjeron por factores externos de la fermentación. Esto puede explicarse porque en la metodología empleada en los días hábiles de la semana se procuraba homogenizar el medio de cultivo con el difusor de aire antes del muestreo. Entonces, durante intervalos cortos de tiempo, se movía de posición el difusor de tal manera que la biomasa asentada al fondo del reactor se homogenizara nuevamente con el medio de cultivo. Por ende, cada 24 horas se realizaba esta homogenización extra en el medio de cultivo. Sin embargo, del día viernes, que era el último día de la semana en la que se muestreaba la fermentación, al día lunes, pasaban 72 horas sin homogenizarse el medio de cultivo. Cabe destacar que estos intervalos de tiempo sin muestreo ocurrieron 3 veces en cada una de las fermentaciones de 21 días analizadas.

Por lo tanto, se infiere que esta falta de homogenización dio lugar a un mayor asentamiento de la biomasa y del medio de cultivo en el fondo del reactor. Se considera que este fenómeno provocó que el crecimiento celular se viera afectado, puesto que al asentarse el medio de cultivo, también pudo asentarse los nitratos y provocar que en todo el reactor no hubiese una disponibilidad homogénea del nutriente, afectando la tasa de crecimiento celular, la cual se refleja en las gráficas. De la misma manera, al estar asentada parte de la concentración celular, si bien las microalgas contaban con disponibilidad de nitrato, puede que haya provocado que las células no estuvieran homogenizadas de la misma manera para recibir la misma cantidad e intensidad lumínica, lo cual pudo haber afectado la tasa a la que realizan la fotosíntesis y, en consecuencia, no poder reproducirse a la misma tasa que antes, también reflejándose en las gráficas. Por ende, el consumo de nitratos no fue homogéneo ni a la misma tasa durante esos días de la fermentación, provocando el comportamiento reflejado en las gráficas.

En cambio, al observar el comportamiento de las gráficas durante los días de fermentación de coinciden con los días hábiles, se obtiene que dicho comportamiento es continuo y, en el caso de las fases exponenciales, presentan el comportamiento esperado para la fase. De la misma manera, al observar el consumo de los nitratos, se observa que este es continuo y es el esperado según la fase de crecimiento celular en la que se le analice. Por lo tanto, se confirmaría que la homogenización del medio de cultivo, que se brindó de forma extra antes de cada muestreo, favoreció a que la biomasa y el medio de cultivo no se asentaran durante esos días y permitiría que la fermentación se diera adecuadamente sin verse afecta por los fenómenos discutidos anteriormente.

Debido a esto se procedió a definir parámetros cinéticos que explicasen el fenómeno ocurrido durante los días de fin de semana para todas las fermentaciones a las distintas

concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno. Luego, se procuró ajustar el modelo cinético con parámetros cinéticos que explicasen el comportamiento del crecimiento celular y el consumo de sustrato durante los días hábiles donde ocurría la fermentación para todas las fermentaciones. Sin embargo, se observó que los datos experimentales de las fermentaciones no se adaptaban. Por lo tanto, se procedió a ajustar cada fermentación con el modelo cinético, dando como resultado parámetros cinéticos distintos para cada fermentación e incluso, conforme avanza el tiempo de fermentación, después de cada “escalón estacionario” de los fines de semana, se definió valores distintos para el rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato, para que estos lograsen explicar el crecimiento celular y el consumo de sustrato conforme el tiempo de fermentación avanza y dependiendo de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno a la que fueron sometidas las microalgas. En el Cuadro 4 se expone un resumen de estos parámetros cinéticos definidos para cada fermentación.

Por lo tanto, no se logró proponer un único modelo cinético que predijera el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su consumo de sustrato bajo cualquier concentración inicial de la fuente de nitrógeno. En cambio, se propuso un modelo cinético que predice el crecimiento celular y el consumo de sustrato para cada concentración inicial de la fuente de nitrógeno analizada. Esto se debe a que, al estar las microalgas en privación de nitrógeno, comienzan a acumular lípidos, por lo que su composición celular, e incluso tamaño, varía (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). De igual forma, al tener las microalgas mayor disponibilidad de nitrato, pueden reproducirse más y aumentar su tamaño celular (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Por ende, se infiere que las microalgas cambian su composición intracelular dependiendo de la concentración de nitrógeno a la que son sometidas, lo cual influye en su crecimiento celular y consumo de sustrato, provocando que un solo modelo cinético, como el propuesto en el presente trabajo, no pueda predecir con exactitud el crecimiento celular y el consumo de sustrato, puesto que se estaría analizando células con distintas composición y requerimientos (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Es por esto que se recomienda modificar el modelo de Monod, de tal forma que se pueda tomar en cuenta las fluctuaciones de todas las variables del sistema como la concentración del sustrato limitante, concentración de otros nutrientes importantes en el medio, pH, salinidad, temperatura, flujo de aireación, tiempo de iluminación, intensidad lumínica, concentración de sustrato y considerando fenómenos de transferencia de masa, con el fin de obtener un modelo más preciso, el cual pueda predecir el crecimiento celular de las microalgas bajo cualquier concentración inicial de la fuente de nitrato y bajo cualquier fluctuación de las demás variables del sistema. Por otra parte, realizar este modelo cinético más completo, también permitiría evaluar la

influencia de las demás variables sobre el crecimiento celular de las microalgas y su consumo de sustrato, permitiendo así investigar en trabajos posteriores cuáles son las condiciones ideales para optimizar el crecimiento celular de las microalgas.

Para lograr este modelo de Monod más completo se debería considerar variables extras, relacionadas a cada una de las variables del sistema fermentativo, que puedan añadirse a la Ecuación 5 dependiendo de su influencia sobre la velocidad específica de crecimiento celular. Además, se recomienda medir a lo largo del tiempo de fermentación las variables a analizar en el modelo, con el fin de tener datos experimentales que permitan correlacionar su variación con la velocidad específica de crecimiento. Dichos datos podrán graficarse de igual manera en el Software Berkeley Madonna y analizar su ajuste con el nuevo modelo de Monod que incluya dichas variables, con el fin de determinar el efecto de las variables sobre el crecimiento celular de las microalgas.

Por otro lado, también se podría utilizar otro modelo cinético como el modelo de Droop:

$$\mu(Q) = \mu_m \left(1 - \frac{Q_0}{Q} \right)$$

Ecuación 17. Modelo de Droop: velocidad de crecimiento celular específica.

(Benavides *et al.*, 2015).

En donde μ_m es la velocidad de crecimiento celular específica máxima, Q es la cuota intracelular, la cual hace referencia a la concentración total de nutrientes dentro de la célula, y Q_0 es la cuota intracelular mínima, es decir la concentración de nutrientes mínima que se encuentra dentro de las células (Benavides *et al.*, 2015).

Este modelo puede utilizarse de la misma manera en la que se empleó el modelo de Monod con los datos experimentales del presente trabajo. Esto con el objetivo de determinar si con el modelo de Droop se puede explicar de mejor manera, comparado con el modelo de Monod, el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* bajo las condiciones experimentales del presente trabajo. Asimismo, puede utilizarse para considerar en el análisis el almacenamiento interno de lípidos conforme estos se sintetizan y analizar cómo esto afecta el crecimiento celular y el consumo de sustrato, en caso se cuente con los datos experimentales de la producción de lípidos con el tiempo (Lee, Jalalizadeh & Zhang, 2015).

Se recomienda el modelo cinético de Droop puesto que describe el crecimiento celular de microalgas cultivadas dentro de fotobiorreactores bajo condiciones constantes de temperatura e iluminación, así como la habilidad con la que estos microorganismos cuentan para almacenar nutrientes, tales como los lípidos como reserva de energía. Asimismo, este modelo considera un desacople entre el consumo de sustrato por parte de las microalgas y el aumento de la biomasa. Esto podría utilizarse de forma favorable en estudios posteriores para entender de mejor manera cómo la habilidad de las microalgas de seguir consumiendo el nutriente limitante bajo condiciones de estrés y cambiar su metabolismo para sintetizar los lípidos como reserva de energía y ya no sintetizar a la misma tasa las proteínas estructurales necesarias para aumentar la biomasa, puede afectar la cinética de su crecimiento celular y el consumo de sustrato limitante (Benavides *et al.*, 2015).

Cabe hacer énfasis que, el modelo cinético desarrollado en el presente trabajo, ajustado a cada una de las fermentaciones analizadas, si bien no toma en cuenta las fluctuaciones de todas las variables del sistema, si toma en consideración la variación del sustrato limitante. Asumir que las demás variables del sistema se comportan de forma constante en el tiempo, permitió que se analizará específicamente el efecto del cambio del sustrato limitante sobre el crecimiento celular de las microalgas, mediante el modelo cinético propuesto bajo las condiciones empleadas. Esto permitió obtener resultados certeros respecto a qué concentración inicial de la fuente de nitrógeno favorece el crecimiento celular de las microalgas. Además, la simplificación de los fenómenos ocurridos en las fermentaciones mediante el modelo de Monod modificado que se propone en el presente trabajo también permite que en futuras investigaciones, si se desea llegar a una densidad celular específica, se tenga el conocimiento del tiempo necesario, así como la concentración de nutrientes requeridos, para lograr dicha densidad celular, sin invertir más nutrientes, recursos energéticos, ni tiempo. Asimismo, las bases de conocimiento que este trabajo aporta también permitirían que en futuras investigaciones se pueda proponer el escalamiento de los fotobiorreactores empleados en esta investigación gracias al modelo cinético (Lee, 2009; Hu, 2004).

Como se puede observar en las figuras 22, 23, 24 y 25, al emplear el modelo cinético de Monod modificado y ajustar los parámetros cinéticos dependiendo si la fermentación se encuentra en días de fin de semana o en días hábiles, se logra que los modelos se ajusten a los datos experimentales de la concentración celular y a los datos de la concentración de sustrato con un valor de R^2 para ambas curvas mayor al 0.9500 (también considerado como un 95% de confianza) y cercano al 1. Con esto se infiere que el modelo cinético empleado y los ajustes de los parámetros

cinéticos describen con buena exactitud el crecimiento celular de las microalgas y su consumo de sustrato cuando la fermentación se realiza a cualquiera de las concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno. Sin embargo, es importante resaltar que las curvas del modelo cinético tienen un valor más pequeño de R^2 , es decir que presentan un menor ajuste, cuando se ajustan a los datos experimentales de la concentración de sustrato. Esto puede deberse a la precisión con la que el equipo HACH DR 890 permitió cuantificar la concentración de nitrato. Al tratarse de un método colorimétrico puede que haya presentado un mayor error que la metodología empleada para medir la concentración celular de las microalgas con el MUSE, el cual emplea un método más confiable.

Analizando los parámetros cinéticos obtenidos para las fermentaciones (ver Cuadro 4) se obtuvo que el valor de μ_{\max} , para los días de fermentación de coinciden con los días hábiles de las semana, aumenta conforme aumenta la concentración inicial de la fuente de nitrógeno bajo la cual crecieron las microalgas. Siendo 1.0842 días^{-1} el valor más grande obtenido, el cual corresponde a la μ_{\max} , del crecimiento celular de las microalgas a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 1.00$. En cambio, el valor más bajo fue de 0.4718 días^{-1} , correspondiente al μ_{\max} , del crecimiento celular de las microalgas a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 0.10$. Este comportamiento es acorde a lo esperado, puesto que el modelo de Monod se caracteriza porque la velocidad de crecimiento específica incrementa conforme aumente la concentración inicial del sustrato limitante: nitrato. Este resultado también indica que las microalgas al tener mayor disponibilidad de nitrato pueden aumentar su concentración celular a mayor velocidad, tal y como se ha discutido anteriormente (Lee, 2009).

Asimismo, al analizar el parámetro K_s de cada fermentación (ver Cuadro 4), para los días de fermentación de coinciden con los días hábiles de las semana, se obtuvo que valor de este parámetro disminuye conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno bajo la cual crecen las microalgas. Siendo $2.1015 \times 10^{-4} \text{ g NO}_3/\text{mL}$ el valor más grande obtenido, el cual corresponde al K_s , del crecimiento celular de las microalgas a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 1.00$. En cambio, el valor más bajo fue de $2.0014 \times 10^{-6} \text{ g NO}_3/\text{mL}$, correspondiente al K_s del crecimiento celular de las microalgas a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 0.10$. Este comportamiento es acorde a lo esperado, puesto que al disminuir el valor de K_s la afinidad al sustrato aumenta, por lo que se necesita menos concentración de sustrato para que las microalgas alcancen una velocidad específica de crecimiento con la mitad del valor de la μ_{\max} . Por ende, las microalgas al contar con una menor disponibilidad del sustrato limitante: nitrato, incluso al verse obligadas a crecer en un medio de cultivo con deprivación de este nutriente, aumenta su afinidad al sustrato, puesto que deben de aprovechar al máximo posible la poca concentración

disponible, con el fin de sobrevivir y poder reproducirse (Lee, 2009). Esto también confirmaría lo discutido anteriormente.

Al analizar los parámetros Y_{X_1} , Y_{X_2} y Y_{X_3} , los cuales son el rendimiento instantáneo de biomasa respecto al sustrato para la fase lag, exponencial parte 1 y exponencial parte 2, respectivamente (ver Cuadro 4), se obtuvo que su valor aumenta conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Asimismo, mientras el parámetro corresponda a una fase más avanzada del crecimiento celular, su valor también aumenta. El primer comportamiento se debe al mismo fenómeno discutido anteriormente. Conforme a menos disponibilidad de nitrato tengan acceso las microalgas, más aprovecharán la baja concentración para reproducirse, resultando en un buen rendimiento instantáneo de biomasa respecto al poco sustrato presente en el medio de cultivo (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). El segundo comportamiento se debe a que, conforme las microalgas se encuentren en una fase más adelantada del crecimiento celular, la velocidad de crecimiento aumenta proporcionalmente con la concentración celular, por lo que al haber más concentración celular conforme se avanza en las fases del crecimiento celular, más células se producirán por gramo del sustrato limitante (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Cabe resaltar que las excepciones a las generalidades encontradas en el párrafo anterior corresponden al Y_{X_1} y al Y_{X_2} de la fermentación con la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25. El valor del Y_{X_1} resultó ser mayor al valor de este mismo parámetro para la fermentación con la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10. Esto indicaría que el inóculo para la fermentación con la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 se adaptó más rápido y fácil a las condiciones ambientales que el inóculo para la fermentación con la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10, puesto que produjo en la fase lag un mejor rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Por el otro lado, el valor de Y_{X_2} resultó ser menor al valor del Y_{X_1} para la misma fermentación (x0.25). Esto puede deberse a que en las condiciones de esta fermentación, las microalgas pudieron haberse consumido en mayor proporción el sustrato limitante en la fase exponencial 1, dejando así aún menor concentración del sustrato para la fase exponencial 2, por lo que no se logró un mayor rendimiento instantáneo de células en esta fase como era de esperarse (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Al analizar el parámetro Y_{X_4} , el cual es el rendimiento instantáneo de biomasa respecto al sustrato para la fase estacionaria (ver Cuadro 4), se obtuvo el mismo valor para todas las fermentaciones, independientemente de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Esto

indica que en la fase estacionaria las microalgas producen el mismo rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato sin importar a qué concentración inicial de nitrógeno inició su fermentación. Esto puede deberse a que el sustrato limitante ya se está agotando por completo y a que las microalgas se reproducen y mueren a la misma tasa, por lo que no hay diferencia en el rendimiento instantáneo de células entre fermentaciones (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Al analizar los parámetros cinéticos que describen el fenómeno que ocurre en los días de fermentación que coinciden con los días de fin de semana (ver Cuadro 4), se obtiene que los valores de $\mu_{\max f}$, K_{Sf} y Y_{Xf} , los cuales corresponden a la velocidad específica máxima, la afinidad al sustrato y al rendimiento instantáneo de biomasa respecto al sustrato, respectivamente, son iguales para todas las fermentaciones, independientemente de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno a la que se llevaron a cabo. Esto se definió así puesto que es el mismo fenómeno el que afecta a todas las fermentaciones en los días de fin de semana, tal y como se discutió anteriormente. Sin embargo, al comparar estos parámetros con cada uno de los parámetros de cada fermentación, se obtiene que el valor de $\mu_{\max f}$ es muchísimo mayor que los valores de μ_{\max} de cada fermentación. De la misma forma, el valor de K_{Sf} es mucho muchísimo mayor que los valores de K_s de cada fermentación. Los valores de estos parámetros indicarían entonces que las microalgas cuentan con una afinidad al sustrato muchísimo menor en los días de fin de semana que en los días hábiles de la semana, lo cual respaldaría el fenómeno discutido anteriormente, en el que se resalta que al sedimentarse las microalgas y el medio de cultivo, no se cuenta con la misma homogeneidad del sustrato y las microalgas no lo pueden aprovechar de la misma manera, viéndose afectado así su crecimiento celular (Hu, 2004; Lee, 2009).

Asimismo, se obtiene con los valores de $\mu_{\max f}$ que las microalgas alcanzan una mayor velocidad de crecimiento específica en los días de fin de semana. Sin embargo, esto no es acorde a lo discutido anteriormente ni a los resultados que presentan las gráficas del crecimiento celular para cada fermentación, puesto que después del lapso del fin de semana no se observa un crecimiento abrupto de la concentración celular, tal y como lo sugiere el valor del parámetro. A pesar de esto, los valores tan grandes del $\mu_{\max f}$ se explicarían por qué las microalgas presentan muy baja afinidad por el sustrato, por lo que las microalgas en la fermentación de los fines de semana procurarían aprovechar el poco nitrato que son capaces de utilizar para mantener su densidad celular, pero no crecen a la misma tasa que lo sugiere $\mu_{\max f}$ debido a la baja afinidad por el sustrato (Hu, 2004; Lee, 2009).

Por último, se observa que el valor de Y_{Xf} es mayor o muy similar al valor de Y_{X1} para cada fermentación. Esto es acorde a lo esperado, puesto que el rendimiento instantáneo de la fase lag

debería ser bajo, ya que las microalgas se están adaptando al medio de cultivo. En cambio, en el primer fin de semana donde se llevó a cabo la fermentación, ya las microalgas pudieron haber terminado la fase lag y comenzado la fase de aceleración, donde el rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato puede aumentar (Hu, 2004; Lee, 2009).

De la misma forma, al comparar el valor de Y_{X_f} con el valor de Y_{X_2} para cada fermentación, se obtiene que Y_{X_f} es menor en casi todas las fermentaciones, excepto para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00. Esto puede explicarse porque, al encontrarse las microalgas en la primera parte de la fase exponencial, comienzan a reproducirse a mayor velocidad, se genera más densidad celular y el consumo de nitrato también aumenta (Lee, 2009). Por ende, el rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato será mayor en la fase exponencial que en el “escalón estacionario” que se da en los fines de semana de la fermentación. Esto se debe a que, como se discutió anteriormente, el asentamiento de la biomasa y del medio de cultivo afecta el crecimiento celular. Cabe resaltar que el valor de Y_{X_f} solo fue mayor al valor de Y_{X_2} de la fermentación bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 debido a que, al haber más disponibilidad de sustrato, las microalgas no lo han terminado de aprovechar en la primera parte de la fase exponencial para el aumento de la densidad celular, resultando así en un menor rendimiento instantáneo de células respecto a sustrato, en comparación al rendimiento instantáneo que se logra en el fin de semana siguiente a dicha fase.

Al comparar el valor de Y_{X_f} con el valor de Y_{X_3} para cada fermentación, se obtiene que Y_{X_f} es menor en todas las fermentaciones. Esto nuevamente es acorde a lo esperado, puesto que, tal y como se discutió anteriormente, al encontrarse las microalgas en la segunda parte de la fase exponencial, comienzan a reproducirse a mayor velocidad, se genera más densidad celular y el consumo de nitrato también aumenta. Generando así un mayor rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato, en comparación al rendimiento instantáneo obtenido en el fin de semana siguiente, en donde el crecimiento celular se ve afectado por la sedimentación de la biomasa y el medio de cultivo (Lee, 2009).

Al comparar el valor de Y_{X_f} con el valor de Y_{X_4} , se obtiene que Y_{X_f} es levemente mayor en todas las fermentaciones. Esto puede explicarse porque en la fase estacionaria las microalgas ya han agotado casi por completo el sustrato limitante, por lo que no se reproducen a la misma tasa como en la fase exponencial y resultan en un menor rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato (Lee, 2009). Cabe resaltar que el fin de semana de fermentación que coincidió con la fase estacionaria de las microalgas, no afectó al rendimiento instantáneo de dicha fase, a pesar de que en los días del fin de semana debiese haber un mayor rendimiento instantáneo de células según el

parámetro cinético definido. Esto no representó un mayor rendimiento instantáneo en la fase estacionaria, puesto que, como se discutió anteriormente, la baja afinidad por el sustrato en los fines de semana no permite que las microalgas tengan un gran de rendimiento instantáneo de células respecto al sustrato (Lee, 2009).

Por último, es importante destacar que el rendimiento instantáneo Y_{x3} y Y_{x4} son mayores conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Por ende, estos parámetros cinéticos, al ser los rendimientos instantáneos de la fase exponencial, terminan de validar por qué a menor concentración inicial de la fuente de nitrógeno, se obtiene un mayor rendimiento global de biomasa respecto al sustrato, tal y como se expone en el Cuadro 3, en donde se resalta que a la concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 0.10$ se obtuvo el mayor rendimiento global de biomasa, el cual fue de 72.4731 g biomasa/g NO_3 . La razón de este comportamiento se discute anteriormente, donde vale la pena resaltar que las microalgas, al estar privadas de nitrógeno, aprovechan mejor dicho nutriente para su reproducción (Hu, 2004; Lee, 2009).

*Métodos de lisis celular para las microalgas *N. oculata**

Para determinar cuál puede ser un método efectivo para lisar la pared celular de las microalgas *N. oculata* se seleccionaron tres métodos a comparar: estrés mecánico por licuadora, ultrasonido e hidrólisis ácida con ácido clorhídrico. Estos métodos fueron seleccionados puesto que en la literatura se ha reportado altos porcentajes de lisis celular al utilizarlos. Además, en el caso de los métodos por estrés mecánico e hidrólisis ácida, teóricamente se pueden escalar a un tamaño industrial, lo cual es favorable para la producción de aceites de microalgas (McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013; Phyto, Gu & Hong, 2019). Cabe resaltar que cada método de lisis celular se aplicó por un máximo de 15 minutos, puesto que se considera que es un tiempo efectivo para lograr la lisis celular y para ahorrar energía.

Al analizar el método de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora convencional, se encontró que, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento que se le realiza a la muestra del cultivo de microalgas, mayor es el porcentaje de lisis celular. Siendo un tratamiento por 15 minutos a 12 mil rpm el que permite el mayor porcentaje de lisis celular, el cual es de 12.56 ± 0.90 % (ver Cuadro 5). Además, como se observa en la Figura 48, en la gráfica del perfil de la viabilidad de la muestra de microalgas, generada por el MUSE[®], las células se registraron con tamaños mayores a los normales y con poca o nula viabilidad celular.

Todo este comportamiento es acorde a lo esperado, puesto que, al aumentar el tiempo del tratamiento de lisis celular en la licuadora, se aumenta el tiempo bajo el cual las células estarán sometidas a un cizallamiento sólido. Es decir, las cuchillas afiladas de la licuadora, girando a gran velocidad, podrán entrar en contacto por más tiempo con la pared celular de las microalgas, logrando romper incluso las paredes de algaenato y celulosa de la pared celular (Zhang *et al.*, 2019; D'Hond *et al.*, 2017). Además, las microalgas tendrán mayor probabilidad de colisionar unas con otras y contra las paredes de la licuadora. Por lo tanto, con este efecto se generará mayor disrupción celular y se facilitará la extracción del contenido intracelular (McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013). Cabe agregar que la lisis celular fue confirmada al analizar una muestra del cultivo en el microscopio. En la Figura 47 se observa una ejemplificación de las microalgas que sufrieron de una disrupción en su pared celular a través del método de estrés mecánico utilizando una licuadora. Al comparar esta muestra con las microalgas observadas antes de ser sometidas al tratamiento de lisis celular (ver Figura 44), se puede analizar que el estrés mecánico claramente logró el rompimiento de la pared celular y permitió que la célula liberara su contenido.

Cabe hacer énfasis que el porcentaje de lisis celular reportado en este estudio mediante el estrés mecánico generado por una licuadora no fue el esperado. Al comparar el resultado previamente discutido con el reportado en el estudio de McMillan, Watson, Ali y Jaafar, publicado en el año 2012, en donde se logró $92.95 \pm 0.97\%$ de lisis celular utilizando una batidora de mano (modelo XB982, Asda, Reino Unido) a 3000 rpm por 6 minutos, se resalta claramente que el porcentaje de lisis celular logrado en este estudio fue muy bajo. Esto puede deberse a que en la presente investigación se analizó un mayor volumen de cultivo celular (1 mL) pero a menor concentración ($8.59 * 10^5 \pm 0.0021 * 10^5$ células viables/mL) y se utilizó el analizador de células MUSE® para cuantificar la viabilidad celular de las microalgas antes y después de los tratamientos de lisis celular y no un microscopio de campo brillante Leitz Wetzlar como en el estudio mencionado (ver sección de Antecedentes). El equipo MUSE® se basa en la cuantificación de las células a través del análisis de su tamaño celular mediante un método de fluorescencia. Por lo tanto, la lisis celular lograda con la licuadora pudo no haber sido completamente cuantificada, puesto que el método de lisis celular pudo haber roto parcial o totalmente la pared celular de las microalgas, pero no haber afectado su tamaño, por lo que el equipo pudo no haber detectado la célula como inviable. Por otro lado, es posible que la lisis celular haya sido exitosa en algunas células, por lo que los pequeños fragmentos remanentes pudieron haber sido contabilizados por el equipo como escombros o residuo celular (debris), afectando de esta manera el conteo de viabilidad.

Al analizar el método de lisis celular por ultrasonido, utilizando el procesador de ultrasonido marca hielscher®, modelo UP100H, se encontró que, en un ciclo continuo de tratamiento, tanto a una amplitud de onda del 50% como del 100%, el porcentaje de lisis celular es mayor conforme aumenta el tiempo del tratamiento. Siendo un tratamiento por 15 minutos el que genera el mayor porcentaje de lisis celular. En el caso de un tratamiento a una amplitud de onda del 50% se logró un $2.15 \pm 0.08\%$ de lisis celular. Por el otro lado, con el tratamiento a una amplitud de onda del 100% se logró un $6.29 \pm 0.49\%$ de lisis celular (ver Cuadro 5). Cabe mencionar que se observa en la Figura 50 y en la Figura 52, en las gráficas del perfil de la viabilidad de las muestras de microalgas, generadas por el MUSE®, que las células se registraron con tamaños mayores a los normales y con poca o nula viabilidad celular, siendo las de la Figura 52 las que muestran un menor porcentaje de viabilidad. Por ende, se obtuvo que el tratamiento con ultrasonido genera un mayor porcentaje de lisis celular si se aplica por 15 minutos con un 100% de la amplitud de onda.

Por otra parte, en la Figura 49 se observa una ejemplificación de las microalgas que sufrieron de una disrupción en su pared celular por haber sido sometidas al ultrasonido con un 50% de la amplitud de onda por 15 minutos y en la Figura 51 se observa a las que fueron sometidas al ultrasonido con un 100% de la amplitud de onda por 15 minutos. Al comparar dichas figuras, se puede observar que el ultrasonido con un 100% de la amplitud de onda generó una mayor disrupción en la pared celular. Asimismo, al comparar estas muestras con las microalgas observadas antes de ser sometidas al tratamiento de lisis celular (ver Figura 44), se puede analizar que el ultrasonido a ambas amplitudes de onda claramente logró el rompimiento de la pared celular y permitió que la célula liberara su contenido.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado, puesto que, gracias a que la amplitud en el ultrasonido representa la distancia a la que la punta del sonicador puede fluctuar de forma longitudinal, a mayor amplitud de onda, mayor será la intensidad de la cavitación dentro del medio de cultivo de microalgas a las que se le aplica el ultrasonido, lo cual genera mayor disrupción celular (Liu, Liu, Cui & Yuan, 2022). Además, al someter el cultivo de microalgas por más tiempo bajo el ultrasonido, las células estarán más tiempo bajo el efecto de la cavitación, el cual puede provocar tensión de cizallamiento sobre la pared celular, colisiones entre las células y aumento de temperatura en el medio, por lo que es más probable que la pared celular se debilite y se rompa (McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013). Cabe resaltar que, estos resultados, al igual que los obtenidos por el método de estrés mecánico con licuadora, son considerablemente más bajos que los reportados en el estudio de McMillan, Watson, Ali y Jaafar, 2012. La razón nuevamente se

debería al protocolo utilizado para medir la viabilidad celular de las microalgas, tal y como se discutió anteriormente.

Al analizar el método de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M, se encontró también que, a medida que el tiempo de tratamiento que se le realiza a la muestra del cultivo de microalgas aumenta, mayor es el porcentaje de lisis celular. Siendo un tratamiento por 15 minutos, en conjunto de una leve agitación, el que permite un mayor porcentaje de lisis celular, el cual es de 3.87 ± 2.12 % (ver Cuadro 5). Asimismo, analizando la gráfica del perfil de la viabilidad de la muestra de microalgas, generada por el MUSE[®], como se puede observar en la Figura 54, se obtuvo que solamente un pequeño número de células se registraron con tamaños mayores a los normales y con poca o nula viabilidad celular. Por un lado, el comportamiento del resultado es acorde a lo esperado, puesto que, al aumentar el tiempo del tratamiento de lisis celular con ácido clorhídrico, las células estarán más expuestas a una alta oxidación en los carbohidratos de la pared celular, sufrirán de un debilitamiento en los enlaces de los polisacáridos, así como de la desnaturalización en las proteínas de la pared, generando un debilitamiento y posterior rompimiento de la pared celular (Phyo, Gu & Hong, 2019).

A pesar de esto, como se menciona anteriormente, el bajo porcentaje de lisis celular y el perfil de viabilidad obtenidos, presentan valores muchísimos más bajos de los esperados, lo cual indicaría en primera instancia que el método de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M no es efectivo para las microalgas *N. oculata*. Sin embargo, como se observa en la Figura 53, la ejemplificación de las microalgas que sufrieron de una disrupción en su pared celular por haber sido sometidas al tratamiento de hidrólisis ácida demuestra que si se logra un daño considerable a la pared celular. Al comparar esta muestra con las microalgas observadas antes de ser sometidas al tratamiento de lisis celular (ver Figura 44), se puede analizar que la hidrólisis ácida logró el rompimiento de la pared celular y permitió que la célula liberara su contenido. Además, en la tesis de Aguilera, 2021, se logró extraer una cantidad cuantificable de aceite de las microalgas utilizando este método de disrupción celular, por lo que si genera la lisis celular. Por ende, al igual que los métodos de lisis celular previamente discutidos, se considera que el protocolo utilizado para medir la viabilidad celular de las microalgas no fue capaz de analizar por completo la ruptura de la pared celular de las microalgas. En este caso, se considera que el ácido clorhídrico si rompió la pared celular de las microalgas, como se observa en la Figura 53, sin embargo, no fue capaz de modificar considerablemente el tamaño de las células, por lo que el equipo MUSE[®], al momento de medir la viabilidad, siguió considerando a dichas células como viables, influyendo entonces en el valor de la viabilidad celular.

En síntesis, se obtuvo que los tres métodos de lisis celular evaluados generan un mayor porcentaje de lisis celular si se proporcionan por 15 minutos al cultivo de microalgas *N. oculata*. El método que generó el mayor porcentaje de lisis celular fue el estrés mecánico inducido por la licuadora (12.56 ± 0.90 %), seguido del método por ultrasonido a una amplitud de onda del 100% (6.29 ± 0.49 %) y, por último, el tratamiento por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M (3.87 ± 2.12 %). Se escogió el método de estrés mecánico y el de ultrasonido a una amplitud de onda del 100% para combinarlos, ya que fueron los métodos que generaron un mayor porcentaje de lisis celular. En primer lugar, como un pretratamiento, se aplicó el ultrasonido con amplitud de onda del 100%, para que la pared celular de las microalgas se debilitará en primer lugar con la cavitación generada. Posteriormente se aplicó el estrés mecánico mediante la licuadora para que las células que hayan quedado solamente con una pared celular debilitada en el pretratamiento puedan terminar de sufrir una disrupción celular más fuerte con el cizallamiento sólido de las aspas y las colisiones, para que el contenido intracelular sea expulsado de las células. Cabe resaltar que los métodos de lisis celular se aplicaron por 7.5 y 15 minutos cada uno, para evaluar si un tratamiento total de 15 minutos es igual de efectivo en el mismo tiempo que los métodos aplicados individualmente y para comparar si se obtiene un mejor porcentaje de lisis celular aplicando ambos métodos por 15 minutos cada uno.

Como se expone en el Cuadro 5, aplicando los métodos de lisis celular de estrés mecánico y ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 7.5 minutos cada uno obtiene un 10.27 ± 2.09 % de lisis celular (ver Figura 55 y Figura 56). Dicho porcentaje, al compararlo con el de los métodos aplicados individualmente, se obtiene que genera una mayor disrupción celular que el método por ultrasonido con una amplitud de onda al 100% y que la hidrólisis ácida aplicados por el mismo tiempo (15 minutos). Sin embargo, dicho porcentaje no es mejor que el obtenido por estrés mecánico aplicado por el mismo tiempo. Es importante recalcar que se esperaba que al combinar los métodos de lisis celular se obtuviese un mayor porcentaje de disrupción celular, puesto que las células estarían expuestas a formas combinadas de daño celular que permitirían debilitar y romper la pared celular de forma más sencilla (Liu, Liu, Cui & Yuan, 2022; McMillan, Watson, Ali & Jaafar, 2013). Este comportamiento si se logró si se compara con el método de hidrólisis ácida y el ultrasonido con una amplitud de onda del 100%. Sin embargo, no fue el caso para el método por estrés mecánico. Esto indicaría que el cizallamiento sólido provocado por las aspas de la licuadora tiene una mayor influencia en el daño celular que el ultrasonido y, por ende, las células sufrirán mayor lisis celular si se exponen por más tiempo al estrés mecánico por licuadora. Esto también tiene sentido, puesto que la cavitación generada por el ultrasonido puede generar una vibración en el medio que no sea lo suficientemente fuerte para romper por completo las capas de algas y

celulosa de las paredes celulares. Sin embargo, el método si podría debilitar dichas capas, las cuales se terminan de romper con el cizallamiento sólido, el cual es más agresivo para romper dichas capas de la pared celular debido a la tensión y velocidad generados en el método de estrés mecánico con licuadora (Zhang *et al.*, 2019; D'Hond *et al.*, 2017).

Por el otro lado, al aplicar el estrés mecánico y el ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 15 minutos cada uno, se obtuvo un porcentaje de lisis celular de $13.02 \pm 1.26\%$ (ver Figura 57 y Figura 58), el cual es mayor que todos los métodos de lisis celular aplicados individualmente por 15 minutos cada uno. Este comportamiento tiene sentido, puesto que al aumentar el tiempo bajo el cual el cultivo celular es sometido a lisis celular (30 minutos en total), las células tendrán más probabilidades de sufrir una disrupción celular. A pesar de esto, si se compara el porcentaje de lisis celular obtenido en este caso, con el obtenido por estrés mecánico por licuadora proporcionado por 15 minutos, se obtiene que solo hubo un aumento del 0.46% de lisis celular. Se considera que este porcentaje es insignificante si se analiza que el tiempo de tratamiento de lisis celular aumento el doble, de 15 a 30 minutos. Esto indicaría también, que la energía suministrada para el tratamiento de lisis celular también aumentó el doble teóricamente, obteniendo solo un pequeño aumento de daño celular. Por ende, se concluyó que el mejor método para lograr la lisis celular en el cultivo de microalgas *N. oculata* es el estrés mecánico por licuadora, proporcionado por 15 minutos. Cabe resaltar que este método es utilizado en algunas aplicaciones industriales, además que es teóricamente más fácil de escalar, es altamente controlable, ofrece altos porcentajes de rendimiento globales para recuperar bioproductos intracelulares y requiere de menor energía a comparación de otros métodos de lisis celular, lo cual hace también que este método sea ideal para aplicarlo al cultivo de microalgas a obtener de los fotobiorreactores de 8 L Biovantage (Zhang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2017).

Métodos de extracción de lípidos con solventes

Para evaluar cuál es el mejor método de solventes para extraer los lípidos producidos por las microalgas *N. oculata* se seleccionaron tres métodos a comparar: cloroformo:metanol (2:1), cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) y etanol:hexano (1:1). Estos métodos fueron seleccionados puesto que en la literatura se ha reportado altos porcentajes de recuperación de lípidos al utilizarlos (Cavonius, Carlsson & Undeland, 2014; Chatsungnoen & Chisti, 2016; Hanupurti & Kristiawan, 2014). Cabe resaltar que los métodos fueron utilizados para recuperar una cantidad conocida de aceite vegetal comercial que se encontraba sobre biomasa seca de microalga *N. oculata*. Esto con

el fin de poder cuantificar la cantidad de aceites vegetales que se recuperan con los métodos y para probarlos en un medio similar en el que se utiliza posteriormente, al extraer los lípidos de la biomasa cosechada de los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente. Cabe agregar que se utilizó el aceite vegetal de girasol y soya marca Ideal, ya que este cuenta con ácidos grasos poliinsaturados (8.6 g/14 g de aceite), así como omega-3 (0.4 g/14 g de aceite), al igual que el aceite de las microalgas (Aratboni *et al.*, 2019).

Por lo tanto, en esta parte de la experimentación no se procedió a extraer el aceite vegetal presente en el interior de la biomasa seca de microalgas añadida al sistema, puesto que a dicha biomasa no se le realizó la lisis celular para que su contenido intracelular quedase en el medio. Además, se optó por agregar una cantidad conocida del aceite comercial porque, como se discutió anteriormente, no se logró extraer una cantidad cuantificable de lípidos del interior de la biomasa de microalgas cosechada. Por ende, si se hubiese probado los métodos de extracción de aceite con solventes con el aceite presente en la biomasa de las microalgas, no se hubiese obtenido resultados favorables y no se hubiese podido comparar la efectividad de los métodos. Es por esto que en futuras investigaciones puede evaluarse dichos métodos extrayendo directo de la biomasa los lípidos de las microalgas. Sin embargo, deberá asegurarse que la cantidad de lípidos presentes en la biomasa es cuantificable. Por esto, es probable que se requieran grandes cantidades de biomasa para lograrlo si se emplea la misma metodología del presente trabajo.

En el Cuadro 6 se resume el porcentaje de recuperación de aceite vegetal logrado por cada uno de los tres métodos analizados. Se obtuvo que al utilizar el método cloroformo:metanol (2:1) se logra recuperar la mayor cantidad de aceites, puesto que el porcentaje de recuperación fue del $89.4612 \pm 2.2274\%$. El segundo mejor método para recuperar aceites es el cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1), alcanzado un $84.5762 \pm 2.2274\%$ de recuperación. Y el método evaluado en la presente investigación con el menor porcentaje de recuperación de aceites fue el etanol:hexano (1:1), alcanzando un $80.1023 \pm 2.2274\%$ de recuperación.

Para confirmar que el líquido recuperado de los tres métodos corresponde al aceite vegetal colocado al inicio de la experimentación, se tomó una muestra de 0.5 mL de cada líquido recuperado y fue enviado para su análisis en espectroscopía infrarroja (IR). Como se puede observar en la Figura 59, la cual corresponde al resultado de IR del líquido recuperado con el método cloroformo:metanol (2:1), así como en la Figura 60, que corresponde al resultado utilizando el método cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1), y en la Figura 61, que corresponde al resultado utilizando el método etanol:hexano (1:1), todos los resultados de IR son prácticamente iguales. Además, al compararlos con el IR obtenido de la muestra original del aceite vegetal utilizado (ver

Figura 39), se obtiene que todos los espectros de IR cuentan con el pico de absorbancia muy intenso alrededor de los 1743 cm^{-1} , cerca de los 1735 cm^{-1} , el cual corresponde al grupo carbonilo presente en los ésteres de los ácidos grasos (Wade, 2017). Asimismo, los resultados cuentan con un doble pico de absorbancia entre los 2854 y 2923 cm^{-1} , en el rango de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, lo cual corresponde al pico esperado de los enlaces carbono-hidrógeno presentes en los ácidos grasos (Wade, 2017). También se observa en los resultados un doble pico de absorbancia a 1159 cm^{-1} y a 1098 cm^{-1} , cercano al pico de absorbancia a los 1200 cm^{-1} que corresponde a los enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos y al pico de absorbancia a 1000 cm^{-1} que corresponde a los enlaces carbono-oxígeno presentes en los ácidos grasos, respectivamente (Wade, 2017). Por lo tanto, se puede asegurar que el líquido recuperado en los tres métodos de extracción de aceites sí corresponde al aceite vegetal que se deseaba recuperar.

Se esperaba que el método de cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) alcanzara un mayor porcentaje de recuperación de aceites vegetales que los otros dos métodos evaluados, puesto que se ha reportado en la literatura que genera mejores rendimientos globales (Chatsungnoen & Chisti, 2016). Sin embargo, en la presente investigación no fue así, no se logró un mejor porcentaje de recuperación que el método cloroformo:metanol (2:1). Si bien el agregar agua como un tercer solvente ayuda a generar una fase polar más grande en la solución, para separar de mejor forma los compuestos polares y apolares y favorecer que los aceites apolares migren a la fase apolar conformada por el cloroformo (Chatsungnoen & Chisti, 2016), el porcentaje de recuperación del método demuestra que no fue igual de eficiente que lo esperado. La diferencia obtenida en este caso puede deberse a que, luego de realizar la extracción con solventes por 24 horas en una ampolla de decantación y llevar a cabo la destilación simple para recuperar el cloroformo y metanol, la fase restante fue llevada a un horno por 60°C para evaporar el agua que pudo quedar en la fase sin afectar a los aceites recuperados. Cabe resaltar que este último paso no fue necesario realizarlo con los otros dos métodos, puesto que los solventes fueron destilados totalmente. Por lo tanto, se considera que se pudo haber perdido aceite durante todo el proceso, perdiendo un porcentaje extra en la etapa de secado, provocando de esta manera un menor porcentaje de recuperación que el método de cloroformo:metanol (2:1).

Cabe hacer énfasis que, utilizando el método cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) y el método cloroformo:metanol (2:1), si se logró un mejor porcentaje de recuperación que utilizando el método etanol:hexano (1:1). Esto concuerda con lo esperado según lo reportado en la literatura (Cavonius, Carlsson & Undeland, 2014, Hanupurti & Kristiawan, 2014; Chatsungnoen & Chisti, 2016). Sin embargo, analizando detenidamente la hidrofobicidad de cada solvente utilizado (ver Figura 11),

se puede observar que el cloroformo cuenta con una hidrofobicidad (valor del logaritmo de P) de 2, el metanol con -0.7, el agua con -1.4, el etanol con -0.4 y el hexano con 4 (Zhang *et al.*, 2019). Por ende, se infiere que la mezcla cloroformo:metanol:agua (2:-0.7:-1.4) tiende a ser ligeramente hidrofílica, la mezcla cloroformo:metanol (2:-0.7) es hidrofóbica y la mezcla etanol:hexano (-0.4:4) sería la mezcla más hidrofóbica.

Esto indicaría que esta última mezcla de solventes debería favorecer más a la recuperación de los lípidos apolares del aceite vegetal, pero como se discutió anteriormente, no fue el caso, puesto que la mezcla etanol:hexano (1:1) obtuvo el menor porcentaje de recuperación de aceite. Por lo tanto, se infiere que la diferencia obtenida con los otros dos métodos puede deberse a la cantidad del solvente apolar agregado a la mezcla o la relación solvente apolar:solvente polar. En el caso de la mezcla cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) se agregó 1.7 veces más del solvente apolar que de los solventes polares. De la misma forma, en la mezcla cloroformo:metanol (2:1) se agregó el doble del solvente apolar que del polar. En cambio, en la mezcla etanol:hexano (1:1) se agregó la misma cantidad del solvente apolar que del polar. Por lo tanto, en este último caso no se contaba con el mismo volumen del solvente apolar que los otros métodos para favorecer la recuperación de los aceites apolares del aceite vegetal (Zhang *et al.*, 2019). Cabe resaltar que esta misma lógica explicaría también por qué se logró un mejor porcentaje de recuperación de aceites vegetales con el método cloroformo:metanol (2:1) que con el método cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) (Zhang *et al.*, 2019).

Por último, cabe agregar que en la presente investigación se logró un mayor porcentaje de recuperación de aceite vegetal con el método etanol:hexano (1:1) que lo esperado según lo reportado en la literatura (Hanupurti & Kristiawan, 2014). Esto puede deberse a que en la experimentación de la presente investigación el aceite vegetal que se buscaba recuperar ya se encontraba totalmente libre en el medio. Es decir, no fue necesario hacer lisis celular para recuperarlo, tal y como se discutió anteriormente, ya que se agregó una cantidad conocida de aceite sobre la biomasa seca. Por ende, en este caso no se logró recuperar el 100% del aceite debido a las pérdidas por la metodología empleada y no por los bajos rendimientos globales de lisis celular que se pudo haber obtenido en la investigación citada.

IX. CONCLUSIONES

1. La concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 (0.300 g NaNO₃/L) permite obtener la mayor producción de biomasa de las microalgas *N. oculata*, siendo esta de 12.5005 g ± 0.0193 g. Sin embargo, la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 (0.030 g NaNO₃/L) permite obtener el mayor rendimiento global de biomasa, el cual es de 72.4731 g biomasa/g NO₃. A pesar de esto, no se logró extraer aceite vegetal de la biomasa cosechada del cultivo de las microalgas *N. oculata*, lo cual puede deberse a una baja producción de aceite y posterior pérdida en los métodos empleados para la extracción de este.
2. Se desarrolló un modelo cinético discontinuo, basado en el modelo de Monod, para describir el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su respectivo consumo del sustrato limitante: nitrato, a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L. Los parámetros cinéticos de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00, la cual generó la mayor producción de biomasa, son: $\mu_{\max} = 1.0842 \text{ días}^{-1}$ y $K_s = 2.1015 \times 10^{-4} \text{ g NO}_3/\text{mL}$ para una operación homogénea. Asimismo, la parametrización permitió obtener distintos rendimientos instantáneos de células respecto al consumo de sustrato en función de la fase del crecimiento celular.
3. Al comparar los distintos métodos de lisis celular evaluados en la presente investigación, se concluyó que el mejor método para inducir la disrupción de la pared celular de las microalgas *N. oculata* es el estrés mecánico inducido por la licuadora en un tiempo total de 15 minutos, puesto que genera un porcentaje de lisis celular del $12.56 \pm 0.90 \%$, el cual es suficiente para que las células liberen los lípidos intracelulares sin requerir más tiempo ni energía.
4. Al comparar los distintos métodos de solventes evaluados en la presente investigación para la extracción de aceites vegetales, se concluyó que el mejor método para recuperar aceite vegetal es el método de solventes que utiliza la combinación cloroformo:metanol (2:1), ya que permite recuperar un $89.4612 \pm 2.2274 \%$ del aceite vegetal.

X. RECOMENDACIONES

1. Analizar el contenido lipídico de las microalgas *N. oculata*, con métodos como la espectroscopia de fluorescencia, previo a la cosecha de la biomasa para determinar si hubo o no una producción de aceites bajo los parámetros experimentales. Incluso se recomienda analizar el contenido lipídico diariamente para obtener el comportamiento de la producción de aceites con el tiempo.
2. A pesar de que se ha reportado que la privación de nitrógeno induce a la mayor producción de lípidos dentro de las microalgas, se recomienda analizar el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su consumo del sustrato limitante bajo concentraciones iniciales de la fuente de nitrato más grandes que las analizadas en la presente investigación, tales como x1.25, x.1.50 y x2.00, con el fin de encontrar la concentración inicial de la fuente de nitratos que permite obtener la mayor producción de biomasa y lípidos.
3. Modelar el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su consumo del sustrato limitante tomando en cuenta otras variables del sistema no variadas en este trabajo, como la concentración de otros nutrientes importantes en el medio, pH, salinidad, temperatura, flujo de aireación, tiempo de iluminación, intensidad lumínica, concentración de sustrato y considerando fenómenos de transferencia de masa, con el fin de obtener un modelo más preciso, el cual pueda predecir el crecimiento celular bajo cualquier concentración inicial de la fuente de nitrato.
4. Modelar el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su consumo del sustrato limitante con otros modelos como el modelo de Droop, para considerar el almacenamiento interno de lípidos conforme estos se sintetizan y analizar cómo esto afecta el crecimiento celular y el consumo de sustrato.
5. Medir la viabilidad celular de las microalgas mediante una nueva técnica, usando el microscopio, para comparar con los valores obtenidos con la técnica de fluorescencia utilizada en el presente trabajo.
6. Estudiar la influencia que tiene el método de lisis celular sobre el método de extracción de aceite con solventes, para evitar la formación de partículas surfactantes u otros compuestos derivados.

7. Evaluar la lisis celular con métodos enzimáticos para determinar si se genera una mayor disrupción celular.
8. Realizar un análisis de los distintos métodos de lisis celular (físicos, químicos y biológicos) que pueden emplearse en las microalgas *N. oculata*, para determinar cuál es el más efectivo y económico para implementar a escala industrial.
9. Evaluar otros métodos de solventes que sean amigables con el medio ambiente, como el hexano:isopropanol, para determinar si existe una opción más ecológica que sea igual de efectiva para recuperar los aceites de las microalgas *N. oculata*.
10. Evaluar los mismos métodos de solventes analizados, pero con la misma relación de solvente apolar:solvente polar, o variando la cantidad del solvente polar o del solvente apolar, para determinar la influencia de la cantidad del solvente apolar sobre la extracción de los aceites de las microalgas *N. oculata*.
11. Evaluar si distintas concentraciones iniciales de fósforo tienen un impacto en el crecimiento celular y posterior producción de aceites dentro de las microalgas *N. oculata*.
12. Se recomienda preparar el medio f/2 Guillard completo, es decir agregando $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y cianocobalamina (Vitamina B₁₂) al medio preparado en la presente investigación, con el fin de brindar todos los nutrientes a las microalgas y favorecer a que tengan un mejor crecimiento en el medio de cultivo.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, C. (2021). *Evaluación de la cinética de un cultivo de microalgas productoras de aceite e implementación de un reactor a escala laboratorio*. Tesis para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- Alami, A. H., Alasad, S., Ali, M., & Alshamsi, M. (2020). Investigating algae for CO₂ capture and accumulation and simultaneous production of biomass for biodiesel production. *Science of The Total Environment*, 143-529.
- Aléman-Nava, G. S., Muylaert, K., Cuellar Bermudez, S. P., Depraetere, O., Rittmann, B., Parra-Saldívar, R., & Vandamme, D. (2017). Two-stage cultivation of *Nannochloropsis oculata* for lipid production using reversible alkaline flocculation. *Bioresource Technology*, 226(1). 18–23
- Anderson, D., Sweeney, D. & Williams, T. (2015). *Estadística para Negocios y Economía*. 12^a ed. Cengage Learning, México.
- Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1). 1-17.
- Audesirk, T. *et al.* (2012). *BIOLOGÍA. La Vida en la Tierra con Fisiología*. 9^a ed. México: Pearson.
- Benavides, M., Telen, D., Lauwers, J., Logist, F., Van Impe, J., & Wouwer, A. V. (2015). Parameter Identification of the Droop Model using Optimal Experiment Design. *IFAC-PapersOnLine*, 48(1), 586–591.
- Bi, Z., & He, B. (2020). Biodiesel from microalgae. *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*, 329–371.
- Borowitzka, M. (1999). «Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters». *Journal of Biotechnology*. 51(70): 313-321.
- Castelló, F. (1993). *Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción*. España: Universitat de Barcelona. 735 págs.

- Cavonius, L., Carlsson, N. & Undeland, I. (2014). Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28): 7313-7322.
- Chatsungnoen, T. & Chisti, Y. (2016). Optimization of oil extraction from *Nannochloropsis sp.* biomass paste. *Algal Research*, 15(1): 100-109.
- Cheng, Chen-Hsi, *et al.* (20011). «Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂ ». *Bioresource Technology*. 5 (102): 10151-10153.
- Chisti, Yusuf. (2007). «Biodiesel from microalgae». *Biotechnology Advances*. 5 (25): 294-306.
- Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Tsai, M.-T., Ong, S.-C., Chen, C.-H., & Lin, C.-S. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, 100(2), 833–838.
- Chua, E.T. & Schenk, P.M. (2017). A biorefinery for *Nannochloropsis*: induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.124>
- Dagnino, E., Medina, C. & Chamorro, E. (2014). Evaluación de Lípidos Extraídos de Microalgas *Nannochloropsis Oculata* para la Producción de Biodiesel. *Revista Tecnología y Ciencia, Universidad Tecnológica Nacional*, 12(25). 87-92.
- Daniells. S. (2015). *Texas storms disrupt Qualitas algal production: “It’s a setback but we’re still in a unique position” says CEO.* <https://www.nutraingredients-usa.com/Article/2015/06/11/Texas-storms-disrupt-Qualitas-algal-production-It-s-a-setback-but-we-re-still-in-a-unique-position-says-CEO>.
- De Jesús, S. & Filho, R. (2020). Recent advances in lipid extraction using green solvents. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 133 (1). 1-35.
- D’Hondt E, Martín-Juárez J, Bolado S *et al.* (2017). 6 - Cell disruption technologies. In: Gonzalez-Fernandez C, Muñoz R (eds) *Microalgae-based biofuels and bioproducts*. Woodhead Publishing Books – Elsevier, Sawston, Cambridge, pp 133–154.
- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J. (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J*. 54: 593-607.

- Eloka-Eboka, A. C., & Inambao, F. L. (2017). Effects of CO₂ sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. *Applied Energy*, *195*, 1100–1111.
- Environmental Protection Agency. (2017). EPA Research. *EPA Research Impacts Report 2017*. Recuperado de <https://www.epa.gov/research/epa-research-impacts-report-2017>
- Eriksen, N. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, *30*(9), 1525–1536.
- Fawley, K. & Fawley, M. (2007). "Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater Nannochloropsis (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa". *Protist*. *158* (3): 325–336. doi:10.1016/j.protis.2007.03.003.
- Ganesan, R. *et al.* (2020). A review on prospective production of biofuel from microalgae. *J. of Biotechnology Reports*, *27*(1). 1-13.
- Gharagozloo, Patricia & Drewry, Jessica & Collins, Aaron & Dempster, Thomas & Choi, Christopher & James, Scott. (2014). Analysis and modeling of Nannochloropsis growth in lab, greenhouse, and raceway experiments. *Journal of Applied Phycology*. *26*.
- Grobbelaar, J. (2004). Algal Nutrition. In Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 97-115). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Guiry, M. (2013). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [http:// www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44568](http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44568)
- Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- Guzman-Burneo, M. & González, R. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador*. Corporación para la Investigación Energética. Quito, Ecuador, 143 p.
- HACH. (2009). *Portable Datalogging Colorimeter Instrument Manual* [archivo PDF]. Disponible [file:///C:/Users/anacr/Downloads/DR%20800%20Series%20Portable%20Datalogging%20Colorimeters%20Instrument%20Manual%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/anacr/Downloads/DR%20800%20Series%20Portable%20Datalogging%20Colorimeters%20Instrument%20Manual%20(1).pdf)
- Hanupurti, D. & Kristiawan, O. (2014). The extraction of oil from *Nannochloropsis sp.* microalgae using ultrasonic and fermentation as cell disruption. *Scientific Contributions Oil & Gas*, *37*(1): 63 – 67.

- Harrison, S., Griffiths, M., Langley, N., Vengadajellum, C., & Van Hille, R. (2010). Microalgal Culture as a Feedstock for Bioenergy, Chemicals and Nutrition. In R. Baltz, A. Demain, & J. Davies, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (3 ed., pp. 577-590). Washington, DC: ASM Press.
- He, Y., Zhang, B., Guo, S., Guo, Z., Chen, B., & Wang, M. (2020). Sustainable biodiesel production from the green microalgae *Nannochloropsis*: Novel integrated processes from cultivation to enzyme-assisted extraction and ethanolysis of lipids. *Energy Conversion and Management*, 209, 112618.
- HLPE. (2013). *Los biocombustibles y la seguridad alimentaria*. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. Roma. 157 págs.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.*, 54: 621-639
- Hu, Q. (2004). Environmental Effects on Cell Composition. In Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 83-93). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Kumari, N. & Kumar, R. (2019). Biofuel and co-products from algae solvent extraction. *Journal of Environmental Management*, 247(1), 196–204.
- Lee, J. (2009). *Biochemical Engineering*. Estados Unidos: Washington State University. 945 págs.
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.-K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317–1328.
- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12, 497–512.
- Leong, K. (2021). *Implementación del fotorreactor tubular semicontinuo con columna de burbujas del laboratorio de bioprocesos*. Tesis para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Industrial. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- Liu, Y., Liu, X., Cui, Y. & Yuan, W. (2022). Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 87(1). 1-18.

- Maity, Jyoti, *et al.* (2014). «Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives». *Energy*. 30 (4): 1-10.
- Mallick, N., Bagchi, S., Koley, S., & Singh, A. (2016). Progress and Challenges in Microalgal Biodiesel Production. *Frontiers in Microbiology*. 7. 10.3389/fmicb.2016.01019.
- Manikantan, H., & Squires, T. M. (2020). Surfactant dynamics: hidden variables controlling fluid flows. *Journal of Fluid Mechanics*, 892.
- Martínez, M., Sánchez, R., Meza, E., Ulloa, R. & Saldívar, J. (2017). SÍNTESIS DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* PARA SU USO POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33(1), 85-91.
- McMillan, J. R., Watson, I. A., Ali, M., & Jaafar, W. (2013). Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied Energy*, 103, 128–134.
- Millipore Sigma. (2016). *MUSE[®] Cell Analyzer. User Guide*. [archivo PDF]. Disponible en <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/instruments/muse/Muse%20Cell%20Analyzer%20-%200500-3115.pdf>
- Moreno, J, *et al.* (2016). *De Residuo a Recurso. El Camino hacia la Sostenibilidad*. España: Ediciones Mundi-Prensa. 329 págs.
- Mureed, K. *et al.* (2018). Biodiesel production from algae grown on food industry wastewater. *Environ Monit Assess.* <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6641-3>
- Najjar, Y. S. H., & Abu-Shamleh, A. (2020). Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Research*, 51, 102046. doi:10.1016/j.algal.2020.102046
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis sp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1429–1441.
- Park, J, *et al.* 2011. «Wastewater treatment high-rate algal ponds for biofuel production». *Bioresource Technology*. 47 (102): 35-42.
- Patel, A., Mikes, F., & Matsakas, L. (2018). An Overview of Current Pretreatment Methods Used to Improve Lipid Extraction from Oleaginous Micro-Organisms. *Molecules*, 23(7), 1562.

- Phyo, P., Gu, Y., & Hong, M. (2019). Impact of acidic pH on plant cell wall polysaccharide structure and dynamics: insights into the mechanism of acid growth in plants from solid-state NMR. *Cellulose*, 26(1), 291-304.
- Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., & Arumugam, M. (2015). Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. *Frontiers in Energy Research*, 2. doi:10.3389/fenrg.2014.00061
- Razzak, S. A., Ilyas, M., Ali, S. A. M., & Hossain, M. M. (2015). Effects of CO₂ Concentration and pH on Mixotrophic Growth of *Nannochloropsis oculata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(5), 1290–1302.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112.
- Salazar, L. (2012). *Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel*. Tesis para optar el Título de Ingeniero Industrial y de Sistemas. Perú: Universidad de Piura.
- Sánchez-Torres, H. *et al.* (2008). «Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado». *Ecología Aplicada*. 7 (2):149-158.
- Scott, S. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(1), 277–286.
- Surendhiran, D., & Vijay, M. (2014). Effect of Various Pretreatment for Extracting Intracellular Lipid from *Nannochloropsis oculata* under Nitrogen Replete and Depleted Conditions. *ISRN Chemical Engineering*, 1–9.
- Tamburic B, Guruprasad S, Radford DT, Szabo´ M, Lilley RM, *et al.* (2014). The Effect of Diel Temperature and Light Cycles on the Growth of *Nannochloropsis oculata* in a Photobioreactor Matrix. *PLoS ONE* 9(1): 1-13
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Panamá: Médica Panamericana.

Tredici, M. (2004). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 83-93). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.

Treybal, R. (1981). *Mass Transfer Operations*. Singapore: The McGraw-Hill.

Universidad Rafael Landívar & Instituto de Investigación y Proyección sobre Ciencia y Tecnología. (2018). *Perfil Energético de Guatemala, Bases para el entendimiento del estado actual y las tendencias de la energía* (archivo PDF). Recuperado de <http://www.infoiarna.org.gt/wp-content/uploads/2019/03/Perfil-Energetico-de-Guatemala.pdf>

Wade, L. (2017). *Química Orgánica. Volumen 1*. 9ª edición. México: Pearson.

Wang, M., Yuan, W., Jiang, X., Jing, Y., & Wang, Z. (2014). *Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound*. *Bioresource Technology*, 153, 315–321.

Wei L, Huang X (2017). Long-duration effect of multi-factor stresses on the cellular biochemistry, oil-yielding performance and morphology of *Nannochloropsis oculata*. *PLoS ONE*, 12(3): 1-20.

Wong, M. W. K., Braidy, N., Pickford, R., Sachdev, P. S., & Poljak, A. (2019). Comparison of Single Phase and Biphasic Extraction Protocols for Lipidomic Studies Using Human Plasma. *Frontiers in Neurology*, 10. doi:10.3389/fneur.2019.00879

Zhang R, Parniakov O, Grimi N, Lebovka N, Marchal L, Vorobiev E. (2019). Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioprocess Biosyst Eng*. 42(2):173-186.

XII. ANEXOS

A. DATOS ORIGINALES

Cuadro 7. Concentración molar de los nutrientes necesarios para preparar el medio f/2 Guillard

Nutriente	Solución Stock recomendada (g/L)	Concentración molar en el medio final (M)	Peso molecular (g/mol)	Marca
NaNO ₃	75.0	8.82×10^{-4}	84.99	MERCK
KH ₂ PO ₄	5.0	3.62×10^{-5}	136.09	Mallinckrodt
FeCl ₃	N/A	1.17×10^{-5}	162.22	Fisher Scientific
Na ₂ EDTA	N/A	1.17×10^{-5}	336.21	MERCK
CuSO ₄	9.8	3.93×10^{-8}	159.61	MERCK
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	22.0	7.65×10^{-8}	287.54	MERCK
CoCl ₂ * 6H ₂ O	10.0	4.20×10^{-8}	237.93	MERCK
MnCl ₂ * 4H ₂ O	180.0	9.10×10^{-7}	197.91	MERCK
Tiamina HCl	N/A	2.96×10^{-7}	337.30	QUIRSA
Biotina	1.0	2.05×10^{-9}	244.31	QUIRSA

(Guillard, 1975).

*No se utilizó NaSiO₂*9H₂O puesto que no se tenía disponibilidad del nutriente y Guillard, 1975, recomienda omitirlo si las microalgas no lo requieren, puesto que puede inducir a la precipitación del medio de cultivo. Tampoco se utilizó NaMoO₄*2H₂O ni cianocobalamina (Vitamina B₁₂) porque no se contaba con la disponibilidad. Se recomienda aplicarlos al medio si se cuenta con ellos. Los pesos moleculares de cada reactivo se obtuvieron de sus envases de almacenamiento. Los reactivos contaban con un 99% de pureza.

Cuadro 8. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
10/5/2022	0	0	6.31×10^4	4.60×10^4	72.90
11/5/2022	1	1	7.88×10^5	5.58×10^4	70.80
12/5/2022	2	2	1.36×10^5	1.00×10^5	73.40
13/5/2022	3	3	2.24×10^5	3.81×10^5	81.00
16/5/2022	4	6	6.11×10^5	4.85×10^5	79.30
17/5/2022	5	7	8.26×10^5	6.69×10^5	81.00
18/5/2022	6	8	1.04×10^6	8.14×10^5	78.50
19/5/2022	7	9	1.75×10^6	1.24×10^6	71.10
20/5/2022	8	10	2.63×10^6	1.86×10^6	70.70
23/5/2022	9	13	3.62×10^6	2.96×10^6	81.90
24/5/2022	10	14	4.25×10^6	3.39×10^6	79.80
25/5/2022	11	15	4.59×10^6	3.77×10^6	82.30
26/5/2022	12	16	4.87×10^6	3.98×10^6	81.70

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
27/5/2022	13	17	5.08×10^6	4.05×10^6	79.80
30/5/2022	14	20	5.29×10^6	3.96×10^6	74.90
31/5/2022	15	21	5.39×10^6	4.10×10^6	76.07

Cuadro 9. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
10/5/2022	0	0	29.3	7.90	2.01	20.5
11/5/2022	1	1	28.7	7.99	2.02	20.4
12/5/2022	2	2	27.9	7.84	2.02	21.7
13/5/2022	3	3	26.4	7.95	2.07	21.6
16/5/2022	4	6	24.5	8.12	2.01	21.8
17/5/2022	5	7	21.9	8.17	2.03	21.8
18/5/2022	6	8	19.9	8.15	2.02	21.8

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
19/5/2022	7	9	18.6	8.19	2.02	21.3
20/5/2022	8	10	17.0	8.21	2.09	19.6
23/5/2022	9	13	16.3	8.23	2.03	20.9
24/5/2022	10	14	15.4	8.31	2.05	20.3
25/5/2022	11	15	14.8	8.30	2.03	20.6
26/5/2022	12	16	13.1	8.34	2.07	22.1
27/5/2022	13	17	9.8	8.40	2.05	21.1
30/5/2022	14	20	9.3	8.42	2.06	21.8
31/5/2022	15	21	8.3	8.50	2.08	21.3

Cuadro 10. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
10/5/2022	0	0	5.94×10^4	4.44×10^4	74.80
11/5/2022	1	1	6.95×10^4	5.53×10^4	79.48
12/5/2022	2	2	1.67×10^5	1.37×10^5	82.30
13/5/2022	3	3	4.70×10^5	3.89×10^5	82.70
16/5/2022	4	6	5.84×10^5	4.72×10^5	80.90
17/5/2022	5	7	8.53×10^5	6.65×10^5	78.00
18/5/2022	6	8	9.67×10^5	8.09×10^5	83.70
19/5/2022	7	9	1.41×10^6	1.10×10^6	78.10
20/5/2022	8	10	2.28×10^6	1.74×10^6	76.00
23/5/2022	9	13	3.43×10^6	2.69×10^6	78.50
24/5/2022	10	14	4.39×10^6	3.49×10^6	79.50
25/5/2022	11	15	4.95×10^6	3.73×10^6	75.20
26/5/2022	12	16	4.67×10^6	3.84×10^6	82.20

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
27/5/2022	13	17	5.12×10^6	4.09×10^6	79.90
30/5/2022	14	20	5.40×10^6	4.11×10^6	76.10
31/5/2022	15	21	4.89×10^6	4.13×10^6	84.40

Cuadro 11. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
10/5/2022	0	0	29.1	7.85	2.04	20.60
11/5/2022	1	1	28.5	7.94	2.00	20.70
12/5/2022	2	2	28.2	7.79	1.98	22.00
13/5/2022	3	3	27.2	7.98	2.06	21.70
16/5/2022	4	6	25.4	7.82	2.02	22.00
17/5/2022	5	7	21.1	8.00	2.02	22.60
18/5/2022	6	8	19.9	8.19	2.02	21.90

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
19/5/2022	7	9	18.2	8.17	2.06	21.60
20/5/2022	8	10	17.7	8.36	2.12	20.00
23/5/2022	9	13	16.5	8.18	2.05	21.21
24/5/2022	10	14	15.6	8.47	2.02	20.20
25/5/2022	11	15	14.6	8.22	2.05	20.60
26/5/2022	12	16	11.9	8.59	2.03	22.40
27/5/2022	13	17	9.6	8.51	2.08	21.30
30/5/2022	14	20	8.8	8.45	2.09	21.30
31/5/2022	15	21	8.2	8.51	2.08	21.30

Cuadro 12. Conteos celulares realizados para la fermentación 3 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad ($\pm 0.005 \%$)
19/4/2022	0	0	5.69×10^4	4.49×10^4	78.91
20/4/2022	1	1	6.80×10^4	5.46×10^4	80.30
21/4/2022	2	2	1.51×10^5	1.23×10^5	81.40
22/4/2022	3	3	4.00×10^5	3.18×10^5	79.50
25/4/2022	4	6	5.90×10^5	4.76×10^5	80.70
26/4/2022	5	7	7.54×10^5	6.59×10^5	87.40
27/4/2022	6	8	9.15×10^5	7.96×10^5	87.00
28/4/2022	7	9	1.37×10^6	1.22×10^6	89.20
29/4/2022	8	10	1.99×10^6	1.62×10^6	81.40
2/5/2022	9	13	3.24×10^6	2.70×10^6	83.30
3/5/2022	10	14	4.01×10^6	3.30×10^6	82.40
4/5/2022	11	15	4.44×10^6	3.70×10^6	83.20
5/5/2022	12	16	4.44×10^6	3.86×10^6	83.70

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
6/5/2022	13	17	4.98×10^6	4.11×10^6	82.60
9/5/2022	14	20	5.03×10^6	4.18×10^6	83.10
10/5/2022	15	21	4.99×10^6	4.21×10^6	84.50

Cuadro 13. Mediciones de variables realizados para la fermentación 3 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
19/4/2022	0	0	28.9	7.90	2.03	20.55
20/4/2022	1	1	27.8	7.99	2.03	21.20
21/4/2022	2	2	26.5	7.84	2.00	21.85
22/4/2022	3	3	25.2	7.95	2.07	21.65
25/4/2022	4	6	24.8	8.12	2.05	21.90
26/4/2022	5	7	21.3	8.17	2.03	22.05
27/4/2022	6	8	19.7	8.15	2.02	21.85

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
28/4/2022	7	9	18.4	8.19	2.04	21.45
29/4/2022	8	10	17.0	8.21	2.11	20.58
2/5/2022	9	13	16.5	8.23	2.04	21.06
3/5/2022	10	14	15.5	8.31	2.06	20.25
4/5/2022	11	15	14.2	8.30	2.04	20.60
5/5/2022	12	16	11.8	8.34	2.05	21.54
6/5/2022	13	17	9.6	8.40	2.07	21.20
9/5/2022	14	20	8.5	8.42	2.04	21.55
10/5/2022	15	21	7.8	8.48	2.08	22.12

Cuadro 14. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
31/5/2022	0	0	6.71×10^4	4.50×10^4	67.10

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
1/6/2022	1	1	1.43×10^5	9.72×10^4	68.10
2/6/2022	2	2	1.82×10^5	1.30×10^4	71.50
3/6/2022	3	3	2.92×10^5	2.25×10^5	77.00
7/6/2022	4	7	1.16×10^6	8.57×10^5	74.00
8/6/2022	5	8	1.92×10^6	1.47×10^6	76.70
9/6/2022	6	9	2.83×10^6	2.09×10^6	73.80
10/6/2022	7	10	2.80×10^6	2.24×10^6	79.90
13/6/2022	8	13	4.68×10^6	3.85×10^6	82.20
14/6/2022	9	14	4.44×10^6	3.70×10^6	83.20
15/6/2022	10	15	4.53×10^6	3.82×10^6	84.30
16/06/2022	11	16	4.67×10^6	3.84×10^6	82.20
17/6/2022	12	17	4.71×10^6	3.75×10^6	79.70
20/06/2022	13	20	4.65×10^6	3.69×10^6	79.30
21/6/2022	14	21	4.32×10^6	3.54×10^6	81.90

Cuadro 15. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
31/5/2022	0	0	14.9	8.15	1.97	22.2
1/6/2022	1	1	13.7	8.20	2.00	22.6
2/6/2022	2	2	12.8	8.34	2.03	22.4
3/6/2022	3	3	11.7	8.26	2.02	22.4
7/6/2022	4	7	10.7	8.70	2.01	21.7
8/6/2022	5	8	7.00	8.31	1.99	22.2
9/6/2022	6	9	7.80	8.14	1.97	21.6
10/6/2022	7	10	7.50	8.11	2.01	22.1
13/6/2022	8	13	5.50	8.31	2.02	21.8
14/6/2022	9	14	5.70	8.30	2.01	22.1
15/6/2022	10	15	5.60	8.20	2.01	21.3
16/06/2022	11	16	5.50	8.29	2.02	20.7
17/6/2022	12	17	5.00	8.08	2.01	20.4

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
20/06/2022	13	20	5.60	8.51	2.03	20.8
21/6/2022	14	21	5.30	8.22	2.00	20.0

Cuadro 16. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
31/5/2022	0	0	6.59×10^4	4.57×10^4	69.40
1/6/2022	1	1	1.39×10^5	9.25×10^4	66.70
2/6/2022	2	2	1.82×10^5	1.24×10^5	68.30
3/6/2022	3	3	2.41×10^5	1.79×10^5	74.20
7/6/2022	4	7	6.72×10^5	4.96×10^5	73.70
8/6/2022	5	8	9.73×10^5	7.44×10^5	76.50
9/6/2022	6	9	1.33×10^6	1.02×10^6	76.90
10/6/2022	7	10	1.51×10^6	1.17×10^6	77.40

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
13/6/2022	8	13	3.14×10^6	2.47×10^6	78.70
14/6/2022	9	14	3.59×10^6	2.89×10^6	80.40
15/6/2022	10	15	3.62×10^6	2.88×10^6	79.50
16/06/2022	11	16	3.73×10^6	2.89×10^6	77.60
17/6/2022	12	17	3.76×10^6	3.04×10^6	80.90
20/06/2022	13	20	3.91×10^6	3.06×10^6	78.30
21/6/2022	14	21	4.10×10^6	3.18×10^6	77.70

Cuadro 17. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
31/5/2022	0	0	13.9	8.10	1.95	22.3
1/6/2022	1	1	12.8	8.15	2.00	22.9
2/6/2022	2	2	12.5	8.29	2.03	22.7

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
3/6/2022	3	3	11.3	8.29	2.04	22.5
7/6/2022	4	7	10.1	8.40	2.03	21.9
8/6/2022	5	8	8.90	8.14	2.03	23.0
9/6/2022	6	9	8.50	8.18	1.99	21.7
10/6/2022	7	10	8.50	8.09	2.01	22.4
13/6/2022	8	13	8.50	8.46	2.03	22.2
14/6/2022	9	14	5.50	8.25	2.02	22.4
15/6/2022	10	15	5.30	8.36	2.03	21.2
16/06/2022	11	16	4.30	8.21	2.05	20.7
17/6/2022	12	17	4.10	8.33	2.04	20.7
20/06/2022	13	20	3.00	8.62	2.04	21.0
21/6/2022	14	21	3.20	8.25	2.04	19.5

Cuadro 18. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
12/7/2022	0	0	6.28×10^4	4.59×10^4	73.10
13/7/2022	1	1	8.30×10^4	6.30×10^4	75.90
14/7/2022	2	2	1.27×10^5	8.81×10^4	69.40
15/7/2022	3	3	2.00×10^5	1.52×10^5	76.10
18/7/2022	4	6	4.07×10^5	2.84×10^5	69.90
19/7/2022	5	7	6.46×10^5	5.22×10^5	80.80
20/7/2022	6	8	8.45×10^6	7.02×10^5	83.10
21/7/2022	7	9	1.01×10^6	7.52×10^5	74.70
22/7/2022	8	10	1.80×10^6	1.43×10^6	79.30
25/7/2022	9	13	2.40×10^6	1.77×10^6	74.00
26/7/2022	10	14	3.30×10^6	2.72×10^6	82.50
27/7/2022	11	15	3.53×10^6	2.78×10^6	78.60
28/7/2022	12	16	4.24×10^6	3.39×10^6	80.00

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
29/7/2022	13	17	4.38×10^6	3.45×10^6	78.70
2/8/2022	14	21	4.64×10^6	3.53×10^6	76.00

Cuadro 19. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
12/7/2022	0	0	7.3	8.00	2.01	20.5
13/7/2022	1	1	7.2	8.05	2.03	20.3
14/7/2022	2	2	6.8	8.18	2.02	21.6
15/7/2022	3	3	6.3	8.10	2.04	21.6
18/7/2022	4	6	4.2	8.26	2.01	22.0
19/7/2022	5	7	3.7	8.11	2.02	21.7
20/7/2022	6	8	3.3	8.13	2.02	21.7
21/7/2022	7	9	2.3	8.17	2.04	21.4

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
22/7/2022	8	10	1.9	8.16	2.06	19.8
25/7/2022	9	13	1.6	8.23	2.04	20.5
26/7/2022	10	14	1.5	8.25	2.04	20.5
27/7/2022	11	15	1.2	8.28	2.04	20.4
28/7/2022	12	16	0.8	8.32	2.06	21.9
29/7/2022	13	17	0	8.35	2.04	21.1
2/8/2022	14	21	0	8.40	2.07	21.9

Cuadro 20. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
12/7/2022	0	0	6.14×10^4	4.52×10^4	73.60
13/7/2022	1	1	6.94×10^4	5.44×10^4	78.30
14/7/2022	2	2	1.08×10^5	8.28×10^4	76.90

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
15/7/2022	3	3	1.77×10^5	1.51×10^5	85.10
18/7/2022	4	6	3.52×10^5	2.62×10^5	74.50
19/7/2022	5	7	5.84×10^5	4.72×10^5	80.90
20/7/2022	6	8	7.82×10^5	6.57×10^5	84.10
21/7/2022	7	9	1.05×10^6	8.83×10^5	84.30
22/7/2022	8	10	1.68×10^6	1.25×10^6	74.40
25/7/2022	9	13	2.56×10^6	2.07×10^6	80.70
26/7/2022	10	14	3.32×10^6	2.67×10^6	80.50
27/7/2022	11	15	3.49×10^6	2.76×10^6	79.00
28/7/2022	12	16	4.12×10^6	3.35×10^6	81.40
29/7/2022	13	17	4.25×10^6	3.43×10^6	80.70
2/8/2022	14	21	4.42×10^6	3.52×10^6	79.60

Cuadro 21. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
12/7/2022	0	0	7.2	8.05	2.03	20.4
13/7/2022	1	1	7.1	8.10	2.03	20.0
14/7/2022	2	2	6.9	8.23	2.02	21.3
15/7/2022	3	3	6.4	8.07	2.02	21.5
18/7/2022	4	6	5.5	8.56	1.99	21.8
19/7/2022	5	7	4.9	8.28	2.01	20.9
20/7/2022	6	8	4.3	8.09	2.00	21.6
21/7/2022	7	9	3.9	8.19	2.04	21.1
22/7/2022	8	10	2.5	8.01	2.05	19.4
25/7/2022	9	13	1.7	8.28	2.03	20.2
26/7/2022	10	14	1.2	8.09	2.02	20.6
27/7/2022	11	15	1.2	8.36	2.02	20.4
28/7/2022	12	16	0.0	8.07	2.03	21.6

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos diluidos (1:10) (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
29/7/2022	13	17	0.0	8.24	2.03	20.9
2/8/2022	14	21	0.0	8.37	2.03	22.4

Cuadro 22. Conteos celulares realizados para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno $\times 0.10$ en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
21/6/2022	0	0	6.37×10^4	4.63×10^4	72.70
22/6/2022	1	1	9.01×10^4	6.59×10^4	73.20
23/6/2022	2	2	1.28×10^5	8.70×10^4	68.20
24/6/2022	3	3	1.67×10^5	1.27×10^5	75.80
27/6/2022	4	6	4.10×10^5	3.03×10^5	73.90
28/6/2022	5	7	5.65×10^5	4.21×10^5	74.50
29/6/2022	6	8	7.74×10^5	5.59×10^5	72.20
30/6/2022	7	9	9.09×10^5	6.53×10^5	71.90

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
1/7/2022	8	10	1.49×10^6	1.11×10^6	74.80
5/7/2022	9	14	2.95×10^6	2.37×10^6	80.10
6/7/2022	10	15	3.13×10^6	2.35×10^6	75.00
7/7/2022	11	16	3.44×10^6	2.62×10^6	76.10
8/7/2022	12	17	3.62×10^6	2.65×10^6	73.20
11/7/2022	13	20	3.30×10^6	2.15×10^6	65.10
12/7/2022	14	21	3.50×10^6	2.21×10^6	63.00

Cuadro 23. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 1 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos totales (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
21/6/2022	0	0	25.0	7.59	2.03	20.5
22/6/2022	1	1	23.3	7.62	1.99	20.7
23/6/2022	2	2	19.3	7.99	2.00	18.8

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos totales (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
24/6/2022	3	3	15.4	8.05	2.02	20.8
27/6/2022	4	6	11.4	8.44	2.01	20.7
28/6/2022	5	7	11.0	8.06	2.00	20.9
29/6/2022	6	8	11.0	7.98	2.04	21.7
30/6/2022	7	9	7.2	8.10	2.05	21.7
1/7/2022	8	10	5.4	8.55	2.02	21.6
5/7/2022	9	14	4.0	8.66	2.04	21.4
6/7/2022	10	15	1.8	8.74	1.97	21.4
7/7/2022	11	16	1.5	8.75	2.01	21.8
8/7/2022	12	17	0.0	8.71	2.00	21.5
11/7/2022	13	20	0.0	8.70	2.03	21.9
12/7/2022	14	21	0.0	8.72	2.03	22.4

Cuadro 24. Conteos celulares realizados para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^n$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad ($\pm 0.005 \%$)
21/6/2022	0	0	5.35×10^4	4.55×10^4	85.00
22/6/2022	1	1	1.05×10^5	7.64×10^4	73.10
23/6/2022	2	2	1.50×10^5	1.07×10^5	71.10
24/6/2022	3	3	1.76×10^5	1.28×10^5	72.70
27/6/2022	4	6	3.95×10^5	2.88×10^5	72.90
28/6/2022	5	7	5.90×10^5	4.76×10^5	80.70
29/6/2022	6	8	8.14×10^5	6.11×10^5	75.10
30/6/2022	7	9	9.88×10^5	7.46×10^5	75.50
1/7/2022	8	10	1.15×10^6	8.90×10^5	77.40
5/7/2022	9	14	2.84×10^6	2.17×10^6	76.70
6/7/2022	10	15	3.00×10^6	2.28×10^6	76.00
7/7/2022	11	16	2.83×10^6	2.07×10^6	73.00
8/7/2022	12	17	2.62×10^6	2.05×10^6	78.20

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Células totales ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Células viables ($\pm 0.005 \times 10^6$ células/mL)	Porcentaje de viabilidad (± 0.005 %)
11/7/2022	13	20	3.23×10^6	2.20×10^6	68.20
12/7/2022	14	21	3.24×10^6	2.24×10^6	69.30

Cuadro 25. Mediciones de variables realizadas para la fermentación 2 de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos totales (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
21/6/2022	0	0	27.0	7.68	2.00	20.3
22/6/2022	1	1	24.9	7.96	2.01	20.5
23/6/2022	2	2	19.3	8.05	2.04	18.7
24/6/2022	3	3	15.5	8.09	2.03	21.1
27/6/2022	4	6	14.0	8.54	2.00	20.7
28/6/2022	5	7	14.0	8.20	2.01	20.9
29/6/2022	6	8	10.5	8.17	2.04	21.4
30/6/2022	7	9	10.2	8.20	2.01	21.8

Fecha	Número de muestra	Día de fermentación	Nitratos totales (± 0.05 mg/L)	pH (± 0.005)	Salinidad (± 0.005 % (p/p))	Temperatura (± 0.05 °C)
1/7/2022	8	10	6.1	8.60	1.99	21.7
5/7/2022	9	14	4.1	8.15	2.02	21.4
6/7/2022	10	15	3.2	8.80	2.00	21.3
7/7/2022	11	16	3.0	8.80	1.99	22.0
8/7/2022	12	17	2.0	8.75	2.04	21.8
11/7/2022	13	20	0.3	8.69	2.00	21.9
12/7/2022	14	21	0.0	8.74	2.00	22.5

Cuadro 26. Biomasa recuperada de las fermentaciones en los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Concentración de la fuente de nitrógeno	Biomasa recuperada	Biomasa recuperada	Biomasa recuperada
	Reactor 1 (± 0.0001 g)	Reactor 2 (± 0.0001 g)	Reactor 3 (± 0.0001 g)
x1.00	12.5008	12.4811	12.5196
x0.50	11.2127	11.2573	N/A
x0.25	10.3571	10.3601	N/A
x0.10	9.1974	9.0954	N/A

Cuadro 27. Aceite de microalgas *N. oculata* recuperado de las fermentaciones en los fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Concentración de la fuente de nitrógeno	Aceite recuperado Reactor 1 (± 0.0001 g)	Aceite recuperado Reactor 1 (± 0.0001 g)	Aceite recuperado Reactor 1 (± 0.0001 g)
x1.00	0.0000	0.0000	0.0000
x0.50	0.0000	0.0000	N/A
x0.25	0.0000	0.0000	N/A
x0.10	0.0000	0.0000	N/A

Cuadro 28. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular de estrés mecánico inducido por licuadora

Método de lisis celular: Estrés mecánico con licuadora	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Inóculo	0	71.40
Muestra (1)	5	69.60
Muestra (2)	5	68.60
Muestra (3)	5	69.80
Muestra (1)	10	65.10
Muestra (2)	10	63.20
Muestra (3)	10	64.60
Muestra (1)	15	62.90
Muestra (2)	15	62.70
Muestra (3)	15	61.70

Cuadro 29. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular por ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda

Método de lisis celular: Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Inóculo	0	71.40
Muestra (1)	5	70.50
Muestra (2)	5	70.60
Muestra (3)	5	70.90
Muestra (1)	10	70.20
Muestra (2)	10	70.40
Muestra (3)	10	70.30
Muestra (1)	15	69.80
Muestra (2)	15	69.90
Muestra (3)	15	69.90

Cuadro 30. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular por ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda

Método de lisis celular: Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Inóculo	0	71.40
Muestra (1)	5	70.30
Muestra (2)	5	70.50
Muestra (3)	5	70.10
Muestra (1)	10	69.70
Muestra (2)	10	69.60
Muestra (3)	10	69.40

Método de lisis celular: Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Muestra (1)	15	66.80
Muestra (2)	15	66.63
Muestra (3)	15	67.30

Cuadro 31. Viabilidad celular obtenida bajo distintos tiempos de tratamiento del método de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M

Método de lisis celular: Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	Tiempo del tratamiento (min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Inóculo	0	71.40
Muestra (1)	5	71.10
Muestra (2)	5	70.80
Muestra (3)	5	71.10
Muestra (1)	10	68.90
Muestra (2)	10	70.10
Muestra (3)	10	70.50
Muestra (1)	15	69.30
Muestra (2)	15	66.90
Muestra (3)	15	69.70

Cuadro 32. Viabilidad celular obtenida bajo el tratamiento del método de lisis celular conformado por la combinación de estrés mecánico con licuadora y ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda aplicados por el mismo intervalo de tiempo (7.5 minutos)

Método de lisis celular: Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	Tiempo del tratamiento (min/min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Inóculo	0	71.70
Muestra (1)	7.5/7.5	63.10
Muestra (2)	7.5/7.5	63.90
Muestra (3)	7.5/7.5	66.00

Cuadro 33. Viabilidad celular obtenida bajo el tratamiento del método de lisis celular conformado por la combinación de estrés mecánico con licuadora y ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda aplicados por el mismo intervalo de tiempo (15 minutos)

Método de lisis celular: Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	Tiempo del tratamiento (min/min)	Viabilidad celular (± 0.005 %)
Inóculo	0	71.70
Muestra (1)	15/15	61.50
Muestra (2)	15/15	62.30
Muestra (3)	15/15	63.30

Cuadro 34. Aceite vegetal de la marca Ideal recuperado mediante distintos métodos de recuperación de aceite por solventes

Método de solventes	Biomasa en el medio (± 0.0001 g)	Aceite vegetal inicial (± 0.0001 g)	Solvente utilizado (± 0.0001 g)	Aceite vegetal recuperado (± 0.0001 g)
Cloroformo : metanol (2:1) (Prueba 1)	2.5000	2.6000	102.0000	2.2859
Cloroformo : metanol (2:1) (Prueba 2)	2.5667	2.5598	102.5300	2.3554
Cloroformo : metanol (2:1) (Prueba 3)	2.5340	2.4680	100.0400	2.1828
Cloroformo : metanol : agua (5.7:3:1)	2.5253	2.5036	100.5780	2.1174
Etanol : hexano (1:1)	2.5075	2.5347	100.8440	2.0303

B. DATOS CALCULADOS

Cuadro 35. Solución de nitrato de sodio preparada y cantidades necesarias para las distintas concentraciones iniciales de nitrato para las fermentaciones

Nutriente	Solución Stock preparada (g/L)	Concentración molar de la solución stock (M)	Cantidad para concentración inicial de 0.300 g NaNO ₃ /L (mL)	Cantidad para concentración inicial de 0.150 g NaNO ₃ /L (mL)	Cantidad para concentración inicial 0.075 g NaNO ₃ /L (mL)	Cantidad para concentración inicial 0.030 g NaNO ₃ /L (mL)
NaNO ₃	21.25	0.25	70.60	35.30	17.65	7.06

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. El valor obtenido para la solución stock preparada se calculó como se muestra en el cálculo 1 y los valores obtenidos de la cantidad necesaria de la solución de NaNO₃ para lograr distintas concentraciones iniciales se calcularon como se muestra en el cálculo 2.

Cuadro 36. Soluciones y sus cantidades para preparar medio f/2 Guillard

Nutriente	Solución Stock preparada	Concentración molar de la solución stock (M)	Cantidad para preparar 1 L de medio (mL)	Cantidad para preparar 45 L de medio (mL)
K ₂ HPO ₄	1.250g/250mL	3.674×10 ⁻²	0.985	44.330
Solución trazas de metal (1 L)	Ver Cuadro 37	Ver Cuadro 37	1.000	45.000
Solución de vitaminas (1 L)	Ver Cuadro 38	Ver Cuadro 38	0.500	22.500

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. La concentración molar de la solución stock se obtuvo con el cálculo 3. La cantidad en gramos de reactivo K₂HPO₄ necesario para preparar la solución stock a un nuevo volumen se obtuvo con el cálculo 4. La cantidad de reactivo para preparar 1 L de medio se obtuvo de Guillard, 1975. La cantidad de reactivo para preparar 45 L de medio se obtuvo con el cálculo 5.

Cuadro 37. Nutrientes y sus cantidades para preparar 1 L de solución de trazas de metal

Nutriente	Solución Stock preparada	Concentración molar de la solución stock (M)	Cantidad para preparar 1 L de solución
FeCl ₃	N/A	N/A	1.90 g
Na ₂ EDTA	N/A	N/A	3.93 g
CuSO ₄	0.502g/80mL	3.93×10 ⁻²	1.00
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	1.760g/80mL	7.65×10 ⁻²	1.00
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.800g/80mL	4.20×10 ⁻²	1.00
MnCl ₂ * 4H ₂ O	14.400g/80mL	9.10×10 ⁻¹	1.00

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. La concentración molar de la solución stock se obtuvo con el cálculo 3. La cantidad en gramos de reactivo necesario para preparar la solución stock a un nuevo volumen se obtuvo con el cálculo 4. La cantidad de reactivo para preparar 1 L de medio se obtuvo de Guillard, 1975.

Cuadro 38. Nutrientes y sus cantidades para preparar 1 L de solución de vitaminas

Nutriente	Marca	Solución Stock preparada (g/L)	Concentración molar de la solución stock (M)	Cantidad para preparar 1 L de solución
Tiamina HCl	QUIRSA	N/A	N/A	0.200 g
Biotina	QUIRSA	1	4.09×10 ⁻³	1 mL

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. La concentración molar de la solución stock se obtuvo con el cálculo 3. La solución stock y la cantidad de reactivo para preparar 1 L de medio se obtuvo de Guillard, 1975.

Cuadro 39. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 250 mL de la solución de cloroformo:metanol (2:1)

Reactivo	Marca	Cantidad requerida (mL)
Cloroformo	MERCK	167
Metanol	MERCK	83

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. Para obtener la cantidad de cada reactivo para preparar la solución de 250 mL de cloroformo:metanol (2:1) se utilizó el cálculo 6 y 7, respectivamente.

Cuadro 40. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 250 mL de la solución de cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)

Reactivo	Marca	Cantidad requerida (mL)
Cloroformo	MERCK	146.90
Metanol	MERCK	77.33
Agua destilada	Salvavidas	25.77

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. Para obtener la cantidad de cada reactivo para preparar la solución de 250 mL de cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1) se utilizó el cálculo 8, 9 y 10, respectivamente.

Cuadro 41. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 250 mL de la solución de etanol:hexano (1:1)

Reactivo	Marca	Cantidad requerida (mL)
Etanol	N/A	125
Hexano	Merck	125

*Los reactivos que se utilizaron contaban con un 99% de pureza. Para obtener la cantidad de cada reactivo para preparar la solución de 250 mL de etanol:hexano (1:1) se utilizó el cálculo 11.

Cuadro 42. Reactivos y cantidades necesarias para hacer 1 L de la solución de ácido clorhídrico 1 M

Reactivo	Marca	Cantidad requerida (mL)
Ácido clorhídrico	MERCK	113.94
Agua destilada	Salvavidas	886.06

*El ácido clorhídrico utilizado tenía una concentración del 32% (p/v). Para obtener la cantidad de cada reactivo para preparar la solución de 1 L de HCl 1 M se utilizó el cálculo 12 y 13, respectivamente.

Cuadro 43. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
0	Lag	5.98×10^4	4.51×10^4	75.54
1	Lag	3.09×10^5	5.52×10^4	76.86
2	Lag	1.51×10^5	1.20×10^5	79.03
3	Aceleración	3.65×10^5	3.63×10^5	81.07
6	Exponencial	5.95×10^5	4.78×10^5	80.30
7	Exponencial	8.11×10^5	6.64×10^5	82.13
8	Exponencial	9.74×10^5	8.06×10^5	83.07
9	Exponencial	1.51×10^6	1.19×10^6	79.47

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
10	Exponencial	2.30×10^6	1.74×10^6	76.03
13	Exponencial	3.43×10^6	2.78×10^6	81.23
14	Exponencial	4.22×10^6	3.39×10^6	80.57
15	Exponencial	4.66×10^6	3.73×10^6	80.23
16	Desaceleración	4.66×10^6	3.89×10^6	82.53
17	Estacionaria	5.06×10^6	4.08×10^6	80.77
20	Estacionaria	5.24×10^6	4.08×10^6	78.03
21	Estacionaria	5.09×10^6	4.15×10^6	81.66
Promedio	N/A	N/A	N/A	79.91
Desviación	N/A	N/A	N/A	2.27

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 16. Los promedios se realizaron con el cálculo 14 y la desviación estándar para una muestra con el cálculo 15.

Cuadro 44. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00

Día de fermentación	Nitratos totales	Nitratos totales	Nitratos totales
	corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 3 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
0	2.93×10^{-4}	2.91×10^{-4}	2.89×10^{-4}
1	2.87×10^{-4}	2.85×10^{-4}	2.78×10^{-4}
2	2.79×10^{-4}	2.82×10^{-4}	2.65×10^{-4}
3	2.64×10^{-4}	2.72×10^{-4}	2.52×10^{-4}
6	2.45×10^{-4}	2.54×10^{-4}	2.48×10^{-4}
7	2.19×10^{-4}	2.11×10^{-4}	2.13×10^{-4}
8	1.99×10^{-4}	1.99×10^{-4}	1.97×10^{-4}
9	1.86×10^{-4}	1.82×10^{-4}	1.84×10^{-4}
10	1.70×10^{-4}	1.77×10^{-4}	1.70×10^{-4}
13	1.63×10^{-4}	1.65×10^{-4}	1.65×10^{-4}
14	1.54×10^{-4}	1.56×10^{-4}	1.55×10^{-4}
15	1.48×10^{-4}	1.46×10^{-4}	1.42×10^{-4}
16	1.31×10^{-4}	1.19×10^{-4}	1.18×10^{-4}

Día de fermentación	Nitratos totales	Nitratos totales	Nitratos totales
	corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 3 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
17	9.80×10^{-4}	9.60×10^{-4}	9.60×10^{-4}
20	9.30×10^{-5}	8.80×10^{-5}	8.50×10^{-5}
21	8.30×10^{-5}	8.20×10^{-5}	7.80×10^{-5}

Los nitratos totales se obtuvieron con el cálculo 16. El error asociado al cálculo de nitratos totales se obtuvo con el cálculo 26.

Cuadro 45. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $\times 1.00$

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
0	Lag	2.91×10^{-4}	7.88	2.03	20.6
1	Lag	2.83×10^{-4}	7.97	2.02	20.8
2	Lag	2.75×10^{-4}	7.82	2.00	21.9
3	Aceleración	2.63×10^{-4}	7.96	2.07	21.7
6	Exponencial	2.49×10^{-4}	8.02	2.03	21.9
7	Exponencial	2.14×10^{-4}	8.11	2.03	22.2
8	Exponencial	1.98×10^{-4}	8.16	2.02	21.9

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
9	Exponencial	1.84×10^{-4}	8.18	2.04	21.5
10	Exponencial	1.72×10^{-4}	8.26	2.11	20.1
13	Exponencial	1.64×10^{-4}	8.21	2.04	21.1
14	Exponencial	1.55×10^{-4}	8.36	2.04	20.3
15	Exponencial	1.45×10^{-4}	8.27	2.04	20.6
16	Desaceleración	1.23×10^{-4}	8.42	2.05	22.0
17	Estacionaria	9.67×10^{-5}	8.44	2.07	21.2
20	Estacionaria	8.87×10^{-5}	8.43	2.06	21.6
21	Estacionaria	8.10×10^{-5}	8.50	2.08	21.6
Promedio	N/A	N/A	8.19	2.04	21.3

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 16. Los promedios se realizaron con el cálculo 14.

Cuadro 46. Desviaciones porcentuales y estándar para las medidas de células viables, nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00

Día de fermentación	Desviación porcentual células viables (células/mL)	Desviación porcentual nitratos totales (g/mL)	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
0	5.44%	2.06%	0.03	0.01	0.05
1	3.27%	5.00%	0.03	0.02	0.40
2	46.70%	9.89%	0.03	0.02	0.15
3	32.17%	11.50%	0.02	0.00	0.05
6	4.18%	5.52%	0.17	0.02	0.10
7	2.27%	5.83%	0.10	0.00	0.41
8	3.46%	1.75%	0.02	0.00	0.05
9	19.14%	3.26%	0.01	0.02	0.15
10	20.69%	7.04%	0.09	0.02	0.49
13	16.50%	2.11%	0.03	0.01	0.16
14	8.40%	1.94%	0.09	0.02	0.05
15	2.82%	6.31%	0.04	0.01	0.00

Día de fermentación	Desviación porcentual células viables (células/mL)	Desviación porcentual nitratos totales (g/mL)	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
16	5.83%	17.69%	0.14	0.02	0.44
17	2.24%	3.58%	0.06	0.01	0.10
20	8.26%	13.67%	0.02	0.03	0.25
21	4.11%	9.80%	0.02	0.00	0.47
Promedio	N/A	N/A	0.06	0.01	0.21

Las desviaciones porcentuales se obtuvieron con el cálculo 17. Las desviaciones estándar para una muestra se obtuvieron con el cálculo 15.

Cuadro 47. Promedio de las desviaciones porcentuales de las células viables y nitratos totales para cada fase del crecimiento celular para todas las fermentaciones a cualquier concentración inicial de la fuente de nitrógeno

Fase de crecimiento celular	Promedio de las desviaciones porcentuales de células viables (células/mL)	Promedio de las desviaciones porcentuales de nitratos totales (g/mL)
Lag	18.47%	5.65%
Aceleración	18.18%	8.51%
Exponencial	10.47%	4.03%
Desaceleración	4.04%	10.64%

Fase de crecimiento celular	Promedio de las desviaciones porcentuales de células viables (células/mL)	Promedio de las desviaciones porcentuales de nitratos totales (g/mL)
Estacionaria	6.19%	11.74%

Los promedios se realizaron con el cálculo 14.

Cuadro 48. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x1.00

Día de fermentación	Células viables promedio suavizado (células/mL)	Células viables promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	Nitratos totales promedio suavizado (g/mL)	Nitratos totales promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
0	4.51×10^4	4.51×10^4	2.91×10^{-4}	2.91×10^{-4}
1	5.02×10^4	7.66×10^4	2.87×10^{-4}	2.88×10^{-4}
2	7.34×10^4	1.29×10^5	2.83×10^{-4}	2.82×10^{-4}
3	1.79×10^5	2.15×10^5	2.74×10^{-4}	2.72×10^{-4}
6	3.20×10^5	2.73×10^5	2.62×10^{-4}	2.69×10^{-4}
7	5.02×10^5	4.47×10^5	2.42×10^{-4}	2.59×10^{-4}
8	6.49×10^5	7.16×10^5	2.21×10^{-4}	2.42×10^{-4}
9	8.86×10^5	1.11×10^6	1.99×10^{-4}	2.17×10^{-4}

Día de fermentación	Células viables promedio suavizado (células/mL)	Células viables promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	Nitratos totales promedio suavizado (g/mL)	Nitratos totales promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
10	1.24×10^6	1.62×10^6	1.85×10^{-4}	1.85×10^{-4}
13	1.90×10^6	1.83×10^6	1.74×10^{-4}	1.76×10^{-4}
14	2.64×10^6	2.44×10^6	1.64×10^{-4}	1.55×10^{-4}
15	3.30×10^6	3.06×10^6	1.55×10^{-4}	1.35×10^{-4}
16	3.67×10^6	3.59×10^6	1.41×10^{-4v}	1.17×10^{-4}
17	3.90×10^6	3.97×10^6	1.22×10^{-4}	1.04×10^{-4}
20	4.02×10^6	4.04×10^6	1.03×10^{-4}	1.01×10^{-4}
21	4.10×10^6	4.16×10^6	8.88×10^{-5}	9.07×10^{-5}

El suavizamiento de datos se obtuvo con el cálculo 18.

Cuadro 49. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
0	Lag	6.65×10^4	4.54×10^4	68.25
1	Lag	1.41×10^5	9.49×10^4	67.40
2	Lag	1.82×10^5	1.27×10^5	69.90
3	Aceleración	2.67×10^5	2.02×10^5	75.60
7	Exponencial	9.16×10^5	6.77×10^5	73.85
8	Exponencial	1.45×10^6	1.11×10^6	76.60
9	Exponencial	2.08×10^6	1.56×10^6	75.35
10	Exponencial	2.16×10^6	1.71×10^6	78.65
13	Exponencial	3.91×10^6	3.16×10^6	80.45
14	Desaceleración	4.02×10^6	3.30×10^6	81.80
15	Estacionaria	4.08×10^6	3.35×10^6	81.90
16	Estacionaria	4.20×10^6	3.37×10^6	79.90
17	Estacionaria	4.23×10^6	3.40×10^6	80.30

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
20	Estacionaria	4.28×10^6	3.38×10^6	78.80
21	Estacionaria	4.21×10^6	3.36×10^6	79.80
Promedio	N/A	N/A	N/A	76.57
Desviación	N/A	N/A	N/A	4.80

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 17. Los promedios se realizaron con el cálculo 14 y la desviación estándar para una muestra con el cálculo 15.

Cuadro 50. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x0.50$

Día de fermentación	Nitratos totales corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	Nitratos totales corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
0	1.49×10^{-4}	1.39×10^{-4}
1	1.37×10^{-4}	1.28×10^{-4}
2	1.28×10^{-4}	1.25×10^{-4}
3	1.17×10^{-4}	1.13×10^{-4}
7	1.07×10^{-4}	1.01×10^{-4}
8	7.00×10^{-5}	8.90×10^{-5}

Día de fermentación	Nitratos totales corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	Nitratos totales corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
9	7.80×10^{-5}	8.50×10^{-5}
10	7.50×10^{-5}	8.50×10^{-5}
13	5.50×10^{-5}	8.50×10^{-5}
14	5.70×10^{-5}	5.50×10^{-5}
15	5.60×10^{-5}	5.30×10^{-5}
16	5.50×10^{-5}	4.30×10^{-5}
17	5.00×10^{-5}	4.10×10^{-5}
20	5.60×10^{-5}	3.00×10^{-5}
21	5.30×10^{-5}	3.20×10^{-5}

Los nitratos totales se obtuvieron con el cálculo 16. El error asociado al cálculo de nitratos totales se obtuvo con el cálculo 26.

Cuadro 51. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
0	Lag	1.44×10^{-4}	8.13	1.96	22.3
1	Lag	1.38×10^{-4}	8.18	2.00	22.8
2	Lag	1.34×10^{-4}	8.32	2.03	22.6
3	Aceleración	1.25×10^{-4}	8.28	2.03	22.5
7	Exponencial	1.15×10^{-4}	8.55	2.02	21.8
8	Exponencial	9.95×10^{-5}	8.23	2.01	22.6
9	Exponencial	8.83×10^{-5}	8.16	1.98	21.7
10	Exponencial	8.03×10^{-5}	8.10	2.01	22.3
13	Exponencial	7.72×10^{-5}	8.39	2.03	22.0
14	Desaceleración	6.87×10^{-5}	8.27	2.01	22.3
15	Estacionaria	6.02×10^{-5}	8.28	2.02	21.3
16	Estacionaria	5.32×10^{-5}	8.25	2.04	20.7
17	Estacionaria	4.97×10^{-5}	8.21	2.03	20.6

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
20	Estacionaria	4.58×10^{-5}	8.57	2.04	20.9
21	Estacionaria	4.37×10^{-5}	8.24	2.02	19.8
Promedio	N/A	N/A	8.27	2.01	21.7

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 17. Los promedios se realizaron con el cálculo 14.

Cuadro 52. Desviaciones estándar para las medidas de pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x0.50$

Día de fermentación	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
0	0.04	0.01	0.07
1	0.04	0.00	0.21
2	0.04	0.00	0.21
3	0.02	0.01	0.07
7	0.21	0.01	0.14
8	0.12	0.03	0.57
9	0.03	0.01	0.07

Día de fermentación	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
10	0.01	0.00	0.21
13	0.11	0.01	0.28
14	0.03	0.01	0.22
15	0.11	0.01	0.07
16	0.05	0.02	0.00
17	0.18	0.02	0.21
20	0.08	0.01	0.14
21	0.02	0.03	0.35
Promedio	0.07	0.01	0.19

Las desviaciones estándar para una muestra se obtuvieron con el cálculo 15.

Cuadro 53. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.50

Día de fermentación	Células viables	Células viables	Nitratos totales	Nitratos totales
	promedio suavizado (células/mL)	promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	promedio suavizado (g/mL)	promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
0	4.54×10^4	4.54×10^4	1.44×10^{-4}	1.44×10^{-4}
1	7.01×10^4	7.68×10^4	1.38×10^{-4}	1.41×10^{-4}
2	8.91×10^4	1.30×10^5	1.34×10^{-4}	1.35×10^{-4}
3	1.41×10^5	2.17×10^5	1.25×10^{-4}	1.25×10^{-4}
7	3.35×10^5	4.00×10^5	1.15×10^{-4}	1.19×10^{-4}
8	6.62×10^5	6.59×10^5	9.95×10^{-5}	1.11×10^{-4}
9	1.11×10^6	1.07×10^6	8.83×10^{-5}	9.85×10^{-5}
10	1.46×10^6	1.68×10^6	8.03×10^{-5}	7.97×10^{-5}
13	2.14×10^6	1.76×10^6	7.72×10^{-5}	7.59×10^{-5}
14	2.72×10^6	2.55×10^6	6.87×10^{-5}	6.05×10^{-5}
15	3.27×10^6	3.19×10^6	6.02×10^{-5}	4.79×10^{-5}
16	3.34×10^6	3.38×10^6	5.32×10^{-5}	4.41×10^{-5}

Día de fermentación	Células viables promedio suavizado (células/mL)	Células viables promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	Nitratos totales promedio suavizado (g/mL)	Nitratos totales promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
17	3.37×10^6	3.40×10^6	4.97×10^{-5}	4.37×10^{-5}
20	3.38×10^6	3.40×10^6	4.58×10^{-5}	4.37×10^{-5}
21	3.39×10^6	3.40×10^6	4.37×10^{-5}	4.37×10^{-5}

El suavizamiento de datos se obtuvo con el cálculo 18.

Cuadro 54. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x0.25$

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
0	Lag	6.21×10^4	4.56×10^4	73.35
1	Lag	7.62×10^4	5.87×10^4	77.10
2	Lag	1.18×10^5	8.55×10^4	73.15
3	Aceleración	9.85×10^5	1.52×10^5	80.60
6	Exponencial	3.80×10^5	2.73×10^5	72.20
7	Exponencial	6.15×10^5	4.97×10^5	80.85

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
8	Exponencial	4.62×10^6	6.80×10^5	83.60
9	Exponencial	1.03×10^6	8.18×10^5	79.50
10	Exponencial	1.74×10^6	1.34×10^6	76.85
13	Exponencial	2.48×10^6	1.92×10^6	77.35
14	Exponencial	3.31×10^6	2.70×10^6	81.50
15	Exponencial	3.51×10^6	2.77×10^6	78.80
16	Exponencial	4.18×10^6	3.37×10^6	80.70
17	Desaceleración	4.32×10^6	3.44×10^6	79.70
21	Estacionaria	4.53×10^6	3.53×10^6	77.80
Promedio	N/A	N/A	N/A	78.20
Desviación	N/A	N/A	N/A	3.30

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 18. Los promedios se realizaron con el cálculo 14 y la desviación estándar para una muestra con el cálculo 15.

Cuadro 55. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25

Día de fermentación	Nitratos totales	Nitratos totales
	corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
0	7.30×10^{-5}	7.20×10^{-5}
1	7.20×10^{-5}	7.10×10^{-5}
2	6.80×10^{-5}	6.90×10^{-5}
3	6.30×10^{-5}	6.40×10^{-5}
6	4.20×10^{-5}	5.50×10^{-5}
7	3.70×10^{-5}	4.90×10^{-5}
8	3.30×10^{-5}	4.30×10^{-5}
9	2.30×10^{-5}	3.90×10^{-5}
10	1.90×10^{-5}	2.50×10^{-5}
13	1.60×10^{-5}	1.70×10^{-5}
14	1.50×10^{-5}	1.20×10^{-5}
15	1.20×10^{-5}	1.20×10^{-5}
16	8.00×10^{-6}	0.00

Día de fermentación	Nitratos totales	Nitratos totales
	corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
17	0.00	0.00
21	0.00	0.00

Los nitratos totales se obtuvieron con el cálculo 16. El error asociado al cálculo de nitratos totales se obtuvo con el cálculo 26.

Cuadro 56. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $\times 0.25$

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
0	Lag	7.25×10^{-5}	8.03	2.02	20.5
1	Lag	7.15×10^{-5}	8.08	2.03	20.2
2	Lag	6.85×10^{-5}	8.21	2.02	21.5
3	Aceleración	6.35×10^{-5}	8.09	2.03	21.6
6	Exponencial	4.85×10^{-5}	8.41	2.00	21.9
7	Exponencial	4.30×10^{-5}	8.20	2.02	21.3
8	Exponencial	3.80×10^{-5}	8.11	2.01	21.7
9	Exponencial	3.10×10^{-5}	8.18	2.04	21.3

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
10	Exponencial	2.20×10^{-5}	8.09	2.06	19.6
13	Exponencial	1.65×10^{-5}	8.25	2.03	20.3
14	Exponencial	1.35×10^{-5}	8.17	2.03	20.6
15	Exponencial	1.20×10^{-5}	8.32	2.03	20.4
16	Exponencial	4.00×10^{-6}	8.20	2.05	21.8
17	Desaceleración	0.00	8.30	2.04	21.0
21	Estacionaria	0.00	8.39	2.05	22.2
Promedio	N/A	N/A	8.20	2.03	21.0

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 16. Los promedios se realizaron con el cálculo 14.

Cuadro 57. Desviaciones estándar para las medidas de pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25

Día de fermentación	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
0	0.04	0.01	0.07
1	0.04	0.00	0.21

Día de fermentación	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
2	0.04	0.00	0.21
3	0.02	0.01	0.07
6	0.21	0.01	0.14
7	0.12	0.03	0.57
8	0.03	0.01	0.07
9	0.01	0.00	0.21
10	0.11	0.01	0.28
13	0.03	0.01	0.22
14	0.11	0.01	0.07
15	0.05	0.02	0.00
16	0.18	0.02	0.21
17	0.08	0.01	0.14
21	0.02	0.03	0.35
Promedio	0.07	0.01	0.19

Las desviaciones porcentuales se obtuvieron con el cálculo 17. Las desviaciones estándar para una muestra se obtuvieron con el cálculo 15.

Cuadro 58. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de x0.25

Día de fermentación	Células viables	Células viables	Nitratos totales	Nitratos totales
	promedio suavizado (células/mL)	promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	promedio suavizado (g/mL)	promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
0	4.56×10^4	4.56×10^4	7.25×10^{-5}	7.25×10^{-5}
1	5.21×10^4	7.37×10^4	7.20×10^{-5}	7.16×10^{-5}
2	6.32×10^4	1.19×10^5	7.08×10^{-5}	7.01×10^{-5}
3	9.86×10^4	1.91×10^5	6.78×10^{-5}	6.76×10^{-5}
6	1.70×10^5	2.09×10^5	6.02×10^{-5}	6.68×10^{-5}
7	3.07×10^5	3.34×10^5	5.17×10^{-5}	6.20×10^{-5}
8	4.83×10^5	5.32×10^5	4.32×10^{-5}	5.44×10^{-5}
9	6.65×10^5	8.33×10^5	3.73×10^{-5}	4.29×10^{-5}
10	9.46×10^5	1.26×10^6	3.03×10^{-5}	2.65×10^{-5}
13	1.36×10^6	1.30×10^6	2.32×10^{-5}	2.45×10^{-5}
14	1.98×10^6	1.85×10^6	1.73×10^{-5}	1.81×10^{-5}
15	2.46×10^6	2.47×10^6	1.40×10^{-5}	1.07×10^{-5}

Día de fermentación	Células viables promedio suavizado (células/mL)	Células viables promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	Nitratos totales promedio suavizado (g/mL)	Nitratos totales promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
16	2.94×10^6	2.97×10^6	9.83×10^{-6}	4.68×10^{-6}
17	3.19×10^6	3.19×10^6	5.33×10^{-6}	2.07×10^{-6}
21	3.25×10^6	3.20×10^6	1.33×10^{-6}	1.33×10^{-6}

El suavizamiento de datos se obtuvo con el cálculo 18.

Cuadro 59. Promedio de células totales, células viables y porcentaje de viabilidad para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x0.10$

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
0	Lag	5.86×10^4	4.59×10^4	78.85
1	Lag	9.76×10^4	7.12×10^4	73.15
2	Lag	1.39×10^5	9.70×10^4	69.65
3	Aceleración	1.72×10^5	1.28×10^5	74.25
6	Exponencial	4.03×10^5	2.96×10^5	73.40
7	Exponencial	5.78×10^5	4.49×10^5	77.60

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Porcentaje de viabilidad promedio (%)
8	Exponencial	7.94×10^5	5.85×10^5	73.65
9	Exponencial	9.49×10^5	7.00×10^5	73.70
10	Exponencial	1.32×10^6	1.00×10^6	76.10
14	Exponencial	2.90×10^6	2.27×10^6	78.40
15	Desaceleración	3.07×10^6	2.32×10^6	75.50
16	Estacionaria	3.14×10^6	2.35×10^6	74.55
17	Estacionaria	3.12×10^6	2.35×10^6	75.70
20	Estacionaria	3.27×10^6	2.18×10^6	66.65
21	Estacionaria	3.37×10^6	2.23×10^6	66.15
Promedio	N/A	N/A	N/A	73.82
Desviación	N/A	N/A	N/A	3.79

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 19. Los promedios se realizaron con el cálculo 14 y la desviación estándar para una muestra con el cálculo 15.

Cuadro 60. Nitratos totales para cada corrida de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $\times 0.10$

Día de fermentación	Nitratos totales	Nitratos totales
	corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
0	2.50×10^{-5}	2.70×10^{-5}
1	2.33×10^{-5}	2.49×10^{-5}
2	1.93×10^{-5}	1.93×10^{-5}
3	1.54×10^{-5}	1.55×10^{-5}
6	1.14×10^{-5}	1.40×10^{-5}
7	1.10×10^{-5}	1.40×10^{-5}
8	1.10×10^{-5}	1.05×10^{-5}
9	7.20×10^{-6}	1.02×10^{-5}
10	5.40×10^{-6}	6.10×10^{-6}
14	4.00×10^{-6}	4.10×10^{-6}
15	1.80×10^{-6}	3.20×10^{-6}
16	1.50×10^{-6}	3.00×10^{-6}
17	0.00	2.00×10^{-6}

Día de fermentación	Nitratos totales	Nitratos totales
	corrida 1 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)	corrida 2 ($\pm 0.05 \times 10^{-6}$ g/mL)
20	0.00	3.00×10^{-7}
21	0.00	0.00

Los nitratos totales se obtuvieron con el cálculo 16. El error asociado al cálculo de nitratos totales se obtuvo con el cálculo 26.

Cuadro 61. Promedio de nitratos totales, pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $\times 0.10$

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
0	Lag	2.60×10^{-5}	7.64	2.02	20.4
1	Lag	2.41×10^{-5}	7.79	2.00	20.6
2	Lag	1.93×10^{-5}	8.02	2.02	18.8
3	Aceleración	1.55×10^{-5}	8.07	2.03	21.0
6	Exponencial	1.27×10^{-5}	8.49	2.01	20.7
7	Exponencial	1.25×10^{-5}	8.13	2.01	20.9
8	Exponencial	1.08×10^{-5}	8.08	2.04	21.6
9	Exponencial	8.70×10^{-6}	8.15	2.03	21.8

Día de fermentación	Fase de crecimiento celular	Nitratos totales promedio (g/mL)	pH promedio	Salinidad promedio (% (p/p))	Temperatura promedio (°C)
10	Exponencial	5.75×10^{-6}	8.58	2.01	21.7
14	Exponencial	4.05×10^{-6}	8.41	2.03	21.4
15	Desaceleración	2.50×10^{-6}	8.77	1.99	21.4
16	Estacionaria	2.25×10^{-6}	8.78	2.00	21.9
17	Estacionaria	1.00×10^{-6}	8.73	2.02	21.7
20	Estacionaria	1.50×10^{-7}	8.70	2.02	21.9
21	Estacionaria	0.00	8.73	2.02	22.5
Promedio	N/A	N/A	8.34	2.01	21.2

Las fases del crecimiento celular se definieron cualitativamente al observar la curva de crecimiento celular de la Figura 19. Los promedios se realizaron con el cálculo 14.

Cuadro 62. Desviaciones estándar para las medidas de pH, salinidad y temperatura para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $x0.10$

Día de fermentación	Desviación estándar pH	Desviación estándar Salinidad (% (p/p))	Desviación estándar Temperatura (°C)
0	0.06	0.02	0.14
1	0.24	0.01	0.14

2	0.04	0.03	0.07
3	0.03	0.01	0.21
6	0.07	0.01	0.00
7	0.10	0.01	0.00
8	0.13	0.00	0.21
9	0.07	0.03	0.07
10	0.04	0.02	0.07
14	0.36	0.01	0.00
15	0.04	0.02	0.07
16	0.04	0.01	0.14
17	0.03	0.03	0.21
20	0.01	0.02	0.00
21	0.01	0.02	0.07
Promedio	0.08	0.02	0.09

Las desviaciones porcentuales se obtuvieron con el cálculo 17. Las desviaciones estándar para una muestra se obtuvieron con el cálculo 15.

Cuadro 63. Promedios suavizados de células viables y nitratos totales comparados con los datos calculados con Berkeley Madonna para la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno de $\times 0.10$

Día de fermentación	Células viables	Células viables	Nitratos totales	Nitratos totales
	promedio suavizado (células/mL)	promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	promedio suavizado (g/mL)	promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
0	4.59×10^4	4.59×10^4	2.60×10^{-5}	2.60×10^{-5}
1	5.85×10^4	7.10×10^4	2.51×10^{-5}	2.47×10^{-5}
2	7.14×10^4	1.10×10^5	2.31×10^{-5}	2.28×10^{-5}
3	9.86×10^4	1.69×10^5	1.96×10^{-5}	1.98×10^{-5}
6	1.73×10^5	1.73×10^5	1.58×10^{-5}	1.96×10^{-5}
7	2.90×10^5	2.64×10^5	1.36×10^{-5}	1.83×10^{-5}
8	4.43×10^5	4.03×10^5	1.20×10^{-5}	1.64×10^{-5}
9	5.78×10^5	6.10×10^5	1.07×10^{-5}	1.34×10^{-5}
10	7.61×10^5	9.09×10^5	8.40×10^{-6}	9.13×10^{-6}
14	1.32×10^6	1.33×10^6	6.17×10^{-6}	6.24×10^{-6}
15	1.86×10^6	1.83×10^6	4.10×10^{-6}	3.29×10^{-6}
16	2.31×10^6	2.23×10^6	2.93×10^{-6}	9.30×10^{-7}

Día de fermentación	Células viables promedio suavizado (células/mL)	Células viables promedio obtenido con Berkeley Madonna (células/mL)	Nitratos totales promedio suavizado (g/mL)	Nitratos totales promedio obtenido con Berkeley Madonna (g/mL)
17	2.34×10^6	2.32×10^6	1.92×10^{-6}	4.10×10^{-7}
20	2.29×10^6	2.32×10^6	1.13×10^{-6}	4.10×10^{-7}
21	2.25×10^6	2.32×10^6	3.83×10^{-7}	3.80×10^{-7}

El suavizamiento de datos se obtuvo con el cálculo 18.

Cuadro 64. Coeficientes R^2 de las células viables y los nitratos totales, entre datos experimentales y datos calculados con Berkeley Madonna, para las fermentaciones a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Concentración inicial de la fuente de nitrógeno	Coeficiente R^2 de células viables	Coeficiente R^2 de nitratos totales
x1.00	0.9921	0.9747
x0.50	0.9916	0.9785
x0.25	0.9936	0.9720
x0.10	0.9968	0.9534

Los coeficientes R^2 se obtuvieron con el cálculo 19.

Cuadro 65. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a estrés mecánico por licuadora a distintos tiempos de tratamiento

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Estrés mecánico con licuadora	5	2.52
Estrés mecánico con licuadora	5	3.92
Estrés mecánico con licuadora	5	2.24
Estrés mecánico con licuadora	10	8.82
Estrés mecánico con licuadora	10	11.48
Estrés mecánico con licuadora	10	9.52
Estrés mecánico con licuadora	15	11.90
Estrés mecánico con licuadora	15	12.18
Estrés mecánico con licuadora	15	13.59

El porcentaje de lisis celular se obtuvo con el cálculo 27.

Cuadro 66. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda a distintos tiempos de tratamiento

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	5	1.26
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	5	1.12
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	5	0.70

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	10	1.68
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	10	1.40
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	10	1.54
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	15	2.24
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	15	2.10
Ultrasonido con el 50% de la amplitud de onda	15	2.10

El porcentaje de lisis celular se obtuvo con el cálculo 27.

Cuadro 67. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda a distintos tiempos de tratamiento

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	5	1.54
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	5	1.26
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	5	1.82
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	10	2.38
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	10	2.52
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	10	2.80
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	15	6.44
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	15	6.72
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda	15	5.74

El porcentaje de lisis celular se obtuvo con el cálculo 27.

Cuadro 68. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a hidrólisis ácida por ácido clorhídrico a distintos tiempos de tratamiento

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	5	0.42
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	5	0.84
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	5	0.42
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	10	3.50
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	10	1.82
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	10	1.26
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	15	2.94
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	15	6.30
Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M	15	2.38

El porcentaje de lisis celular se obtuvo con el cálculo 27.

Cuadro 69. Porcentaje de lisis celular obtenido para cada muestra de microalgas sometidas a ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda y estrés mecánico por licuadora a distintos tiempos de tratamiento

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	7.5/7.5	11.99
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	7.5/7.5	10.88
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	7.5/7.5	7.95

Método de lisis celular	Tiempo del tratamiento (min)	Porcentaje de lisis celular (%)
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	15/15	14.23
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	15/15	13.11
Ultrasonido con el 100% de la amplitud de onda/ Estrés mecánico con licuadora	15/15	11.72

El porcentaje de lisis celular se obtuvo con el cálculo 27.

Cuadro 70. Porcentaje de recuperación de aceite con los distintos métodos de extracción de aceite con solventes

Método de solventes	Porcentaje de recuperación (%)
Cloroformo:metanol (2:1)	87.9230
Cloroformo:metanol (2:1)	92.0154
Cloroformo:metanol (2:1)	88.4452
Cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)	84.5762
Etanol:hexano (1:1)	80.1023

El porcentaje de recuperación de aceite se obtuvo con el cálculo 28.

Cuadro 71. Balance de masa de las entradas de los sistemas fermentativos

Concentración inicial de la fuente de nitrógeno	Nitrato de sodio (NaNO ₃) (g)	Medio f/2 Guillard (g)	Sal (g)	Biomasa del inóculo (g)	Agua (g)	Dióxido de carbono total (g)	Dióxido de carbono fijado (g)	Inversión de biomasa (g)	Total (g)
x1.00	1.5000	0.0554	110.0000	0.1476	4509.5595	116.7076	11.6708	13.3405	4737.9700
x0.50	0.7500	0.0554	110.0000	0.1782	4528.1190	116.7076	11.6708	12.6211	4755.8102
x0.25	0.3750	0.0554	110.0000	0.1425	4545.7669	116.7076	11.6708	12.2104	4773.0474
x0.10	0.1500	0.0554	110.0000	0.1638	4556.3130	116.7076	11.6708	12.0067	4783.3897

* El total no incluye el dióxido de carbono fijado ni la inversión de biomasa. Se asumió que se fija un 10% del dióxido de carbono y se consume un 40% del medio f/2 Guillard.

Cuadro 72. Balance de masa de las salidas de los sistemas fermentativos

Concentración inicial de la fuente de nitrógeno	Nitrato de sodio (NaNO ₃) (g)	Medio de cultivo (g)	Dióxido de carbono no fijado (g)	Pérdidas (g)	Total (g)
x1.00	0.4031	4619.1897	105.0368	0.8400	4737.9700
x0.50	0.2115	4637.9407	105.0368	1.3861	4755.8102
x0.25	0.0000	4655.8001	105.0368	1.8518	4773.0474
x0.10	0.0000	4666.3462	105.0368	2.8603	4783.3897

C. CÁLCULOS DE MUESTRA

Cálculo 1. Determinación de la masa de reactivo necesaria para la preparación de una solución de cierta molaridad

$$M \times PM = \text{Gramos de reactivo}$$

$$0.25 \text{ M} \times \frac{84.99 \text{ g NaNO}_3}{1 \text{ mol NaNO}_3} = 21.25 \text{ g NaNO}_3$$

Donde M es molaridad y PM peso molecular. Datos obtenidos del Cuadro 7.

Cálculo 2. Determinación del volumen necesario de la solución stock de NaNO_3 0.25M para preparar medio de cultivo de 5 L a una concentración inicial en g NaNO_3/L

$$[\text{Solución}] \times \frac{1}{PM} \times VF \times \frac{1}{M} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \text{Volumen en mL solución NaNO}_3 \text{ 0.25M}$$

$$0.300 \frac{\text{g NaNO}_3}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mol NaNO}_3}{84.99 \text{ g NaNO}_3} \times 5 \text{ L} \times \frac{1 \text{ L de solución NaNO}_3}{0.25 \text{ mol NaNO}_3} \times \frac{1000 \text{ mL de solución NaNO}_3}{1 \text{ L de solución NaNO}_3} = 70.60 \text{ mL NaNO}_3$$

Donde [Solución] es la concentración de NaNO_3 a la que se desea preparar el medio de cultivo y VF el volumen final del medio de cultivo a preparar. Datos obtenidos del Cuadro 7.

Cálculo 3. Determinación de la molaridad de una solución

$$[\text{Solución}] \times \frac{1}{PM} = M$$

$$5 \frac{\text{g K}_2\text{HPO}_4}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mol K}_2\text{HPO}_4}{136.09 \text{ g K}_2\text{HPO}_4} = 3.67 \times 10^{-2} \text{ M}$$

Donde [Solución] es la concentración de K_2HPO_4 a la que se desea preparar la solución. Datos obtenidos del Cuadro 7.

Cálculo 4. Gramos de reactivo necesario para preparar una solución stock a un nuevo volumen

$$M \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times VF \times PM = \text{Gramos de reactivo}$$

$$3.67 \times 10^{-2} \text{ M} \times \frac{1 \text{ L de solución K}_2\text{HPO}_4}{1000 \text{ mL de solución K}_2\text{HPO}_4} \times 250 \text{ mL de solución K}_2\text{HPO}_4 \times \frac{136.09 \text{ g K}_2\text{HPO}_4}{1 \text{ mol K}_2\text{HPO}_4} = 1.25 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$

Donde VF es el volumen final al que se desea preparar la solución stock de K_2HPO_4 . Datos obtenidos del Cuadro 7.

Cálculo 5. Volumen de reactivo necesario para preparar 45 L de medio de cultivo

$$V_1 \times 45 = V_{45}$$

$$0.985 \text{ mL} \times 45 = 44.33 \text{ mL}$$

Donde V_1 es el volumen del reactivo que se necesita para preparar 1 L de medio de cultivo V_{45} es el volumen del reactivo que se necesita para preparar 45 L de medio de cultivo. Datos obtenidos del Cuadro 36.

Cálculo 6. Volumen de cloroformo necesario para preparar 250 mL de la solución cloroformo:metanol (2:1)

$$\frac{250 \text{ mL}}{3} \times 2 = 167 \text{ mL de cloroformo}$$

Datos obtenidos del Cuadro 39.

Cálculo 7. Volumen de metanol necesario para preparar 250 mL de la solución cloroformo:metanol (2:1)

$$250 \text{ mL} - 167 \text{ mL} = 83 \text{ mL} . \text{ Datos obtenidos del Cuadro 39.}$$

Cálculo 8. Volumen de cloroformo necesario para preparar 250 mL de la solución cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)

$$5.7X + 3x + x = 250 \text{ mL}$$

$$9.7X = 250 \text{ mL}$$

$$X = \frac{250 \text{ mL}}{9.7} \times 5.7 = 146.90 \text{ mL}$$

Donde X es el volumen por encontrar. Datos obtenidos del Cuadro 40.

Cálculo 9. Volumen de metanol necesario para preparar 250 mL de la solución cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)

$$X = \frac{250 \text{ mL}}{9.7} \times 3 = 77.33 \text{ mL}$$

Datos obtenidos del Cuadro 40.

Cálculo 10. Volumen de agua destilada necesario para preparar 250 mL de la solución cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)

$$X = \frac{250 \text{ mL}}{9.7} = 25.77 \text{ mL}$$

Datos obtenidos del Cuadro 40.

Cálculo 11. Volumen de reactivo necesario para preparar 250 mL de la solución etanol:hexano (1:1)

$$\frac{250 \text{ mL}}{2} = 125 \text{ mL}$$

Datos obtenidos del Cuadro 41.

Cálculo 12. Volumen de ácido clorhídrico al 32% p/v necesario para preparar 1 L de solución de HCl 1 M

$$V_{\text{solución}} \times M \times PM \times \frac{1}{[\text{HCl}]} = \text{Volumen de HCl al 32\% (p/v)}$$

$$1 \text{ L de solución de HCl} \times \frac{1 \text{ mol HCl}}{1 \text{ L de solución de HCl}} \times \frac{36.46 \text{ g HCl}}{1 \text{ mol HCl}} \times \frac{100 \text{ mL HCl}}{32 \text{ g HCl}} \\ = 113.94 \text{ mL HCl}$$

Donde $V_{\text{solución}}$ es el volumen que se desea preparar de la solución de HCl 1 M. Datos obtenidos del Cuadro 42.

Cálculo 13. Volumen de agua destilada necesaria para preparar 1 L de solución de HCl 1 M

$$1000 \text{ mL} - 113.94 \text{ mL} = 886.06 \text{ mL}$$

Datos obtenidos del Cuadro 42.

Cálculo 14. Promedio

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{N}$$

$$\frac{(7.70 \times 10^5 + 5.94 \times 10^4 + 5.69 \times 10^4) \text{ células/mL}}{3} = 5.98 \times 10^4 \text{ células/mL}$$

Donde \bar{X} es el promedio, X_N las muestras analizadas y N la cantidad de muestras analizadas. Datos obtenidos de los Cuadros 8, 10 y 12.

Cálculo 15. Desviación estándar para una muestra

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum |X_N - \bar{X}|^2}{N - 1}}$$

$$\sqrt{\frac{|7.90 - 7.88|^2 + |7.85 - 7.88|^2 + |7.90 - 7.88|^2}{3 - 1}} = 0.03$$

Donde σ es la desviación estándar. Cabe resaltar que el cálculo de ejemplo fue realizado con las 3 medidas de pH del día 0 de fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00, de los Cuadros 9, 11 y 13.

Cálculo 16. Nitratos totales en g/mL de una muestra diluida 1:10

$$\text{Nitratos diluidos mg/L} \times \text{Factor de dilución} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}$$

$$= \text{Nitratos totales g/mL}$$

$$29.3 \frac{\text{mg NO}_3}{\text{L}} \times 10 \times \frac{1 \text{ g NO}_3}{1000 \text{ mg NO}_3} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} = 2.93 \times 10^{-4} \frac{\text{g NO}_3}{\text{mL}}$$

Datos obtenidos del Cuadro 9.

Cálculo 17. Desviación porcentual

$$\text{Desviación porcentual} = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 3$$

$$\frac{818.54}{5.98 \times 10^4} \times 3 = 5.44\%$$

Donde 3 fue el valor multiplicado para obtener 3 valores sigma y obtener un rango en el que se encuentre el 99.7% de la población. Datos obtenidos del Cuadro 8.

Cálculo 18. Suavizamiento de datos

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{N}$$

$$\frac{(4.08 \times 10^6 + 4.08 \times 10^6 + 4.15 \times 10^6) \text{ células/mL}}{3} = 4.10 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

Cabe resaltar que el ejemplo se realizó para obtener el último valor de células viables promedio suavizado del Cuadro 48.

Cálculo 19. Coeficiente R²

Para este cálculo se utilizó la fórmula de Excel “COEFICIENTE.R2(conocido_y, conocido_x)”
COEFICIENTE.R2(columna Células viables promedio suavizado Cuadro 48, columna Células viables promedio obtenido con Berkeley Madonna Cuadro 48) = 0.9921

Cálculo 20. Tiempo de generación

$$\frac{t_b - t_B}{\frac{\ln(b) - \ln(B)}{\ln(2)}} = \text{Tiempo de generación}$$
$$\frac{15 - 6}{\frac{\ln(3.73 \times 10^6) - \ln(4.78 \times 10^5)}{\ln(2)}} = 3.03 \text{ días}$$

Donde t_b es el día en el que termina la fase exponencial del crecimiento celular, t_B el día en el que comienza la fase exponencial, b es la concentración celular en el tiempo t_b y B es la concentración celular en el tiempo t_B . Datos obtenidos del Cuadro 8.

Cálculo 21. Productividad

$$\frac{\Delta \text{Concentración celular}}{\Delta \text{Tiempo}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \text{Productividad}$$
$$\frac{(4.51 \times 10^4 - 3.73 \times 10^6) \text{ células/mL}}{(15 - 0) \text{ día}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 2.46 \times 10^8 \frac{\text{células}}{\text{L día}}$$

Cabe resaltar que los cambios en la concentración celular y en el tiempo se determinaron desde el día 0 de la fermentación hasta el punto más alto en la curva de crecimiento celular donde se formase una recta tangente a la curva con la pendiente más grande. Datos obtenidos del Cuadro 43.

Cálculo 22. Rendimiento total

$$\frac{\Delta \text{Concentración celular}}{-\Delta \text{Concentración de nitrato}} = \text{Rendimiento total}$$
$$\frac{(4.10 \times 10^6 - 4.51 \times 10^4) \frac{\text{células}}{\text{mL}}}{-(8.10 \times 10^{-5} - 2.91 \times 10^{-4}) \frac{\text{g NO}_3}{\text{mL}}} = 1.95 \times 10^{10} \text{ células/g NO}_3$$

Datos obtenidos del Cuadro 43.

Cálculo 23. Rendimiento de biomasa

$$\frac{\text{Producción de biomasa}}{[-\Delta\text{Concentración de nitrato}] \times (V_{fbr} - V_r)} = \text{Rendimiento de biomasa}$$

$$\frac{12.5005 \text{ g biomasa}}{[-(8.10 \times 10^{-5} - 2.91 \times 10^{-4}) \text{ g} \frac{\text{NO}_3}{\text{mL}}] \times (5000 - 24) \text{ mL}} = 11.9627 \text{ g biomasa/g NO}_3$$

Donde V_{fbr} es el volumen al que se llenó el fotobiorreactor para la fermentación y V_r el volumen retirado de medio debido al muestreo. Datos obtenidos del Cuadro 45.

Cálculo 24. Propagación de error para sumas y restas

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2} = \text{Propagación de error para sumas y restas}$$

$$\Delta\delta = \sqrt{(8.33 \times 10^3)^2 + (3.91 \times 10^5)^2} = 3.91 \times 10^5$$

$$(\Delta\delta = 3.91 \times 10^5 \times \frac{1}{15} \times 1000 = 2.61 \times 10^7 = 0.26 \times 10^8)$$

Donde Δx es el error del valor 1 analizado y Δy es el error del valor 2 analizado. En este ejemplo se evidencia cómo se calculó la propagación de error para la productividad. Por eso, Δx corresponde al error asociado a la concentración celular inicial y Δy corresponde al error asociado a la concentración celular final. Luego fue necesario dividir el error obtenido entre 15 por ser un entero, que corresponde a los días en los que se evaluó la productividad y luego se tuvo que multiplicar por 1000 que corresponde a la conversión realizada en el cálculo para expresar la productividad en términos de células/L día. Datos obtenidos del Cuadro 2.

Cálculo 25. Propagación de error para multiplicación y división

$$\Delta\delta = \delta \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{y}\right)^2} = \text{Propagación de error para multiplicación y división}$$

$$\Delta\delta = 1.95 \times 10^7 \times \sqrt{\left(\frac{2.57 \times 10^5}{4.10 \times 10^6}\right)^2 + \left(\frac{1.89 \times 10^{-2}}{0.21}\right)^2} = 2.15 \times 10^9$$

Donde Δx es el error del valor 1 analizado, x es el valor 1 analizado, Δy es el error del valor 2 analizado y y es el valor 2 analizado. En este ejemplo se evidencia cómo se calculó la propagación de error para el rendimiento final. Datos obtenidos del Cuadro 2.

Cálculo 26. Propagación de error por multiplicación de enteros

$$\Delta(A \times \delta) = A \times \Delta x = \text{Propagación de error por multiplicación de enteros}$$

$$\Delta\left(\frac{1}{10^6} \times 0.05\right) = 0.05 \times 10^{-6}$$

Donde Δx es el error del valor 1 analizado, A es el entero por el cual se multiplica el resultado (δ) de la operación analizada. En este ejemplo se evidencia cómo se calculó la propagación de error para la medida de nitratos totales. Datos obtenidos del Cuadro 2.

Cálculo 27. Porcentaje de lisis celular

$$\frac{VIA_i - VIA_f}{VIA_i} \times 100 = \text{Porcentaje de lisis celular}$$

$$\frac{71.4 - 69.60}{71.4} \times 100 = 2.52\%$$

Donde VIA_i es la viabilidad de la muestra de microalgas previo al tratamiento de lisis celular y VIA_f es la viabilidad de la muestra de microalgas posterior al tratamiento de lisis celular. Datos obtenidos del Cuadro 28.

Cálculo 28. Porcentaje de recuperación de aceite

$$\frac{A_f}{A_i} \times 100 = \text{Porcentaje de recuperación de aceite}$$

Donde A_i es la cantidad de aceite inicial y A_f es la cantidad de aceite recuperado. Datos obtenidos del Cuadro 34.

D. FOTOGRAFÍAS

Figura 26. Muestra de microalgas *Nannochloropsis oculata* obtenida del reactor de laguna abierta de la Universidad del Valle de Guatemala analizada en cámara de Neubauer bajo microscopio a 10x.



Fuente: Propia.

Figura 27. Sistema de dos fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L marca Biovantage utilizado para las fermentaciones



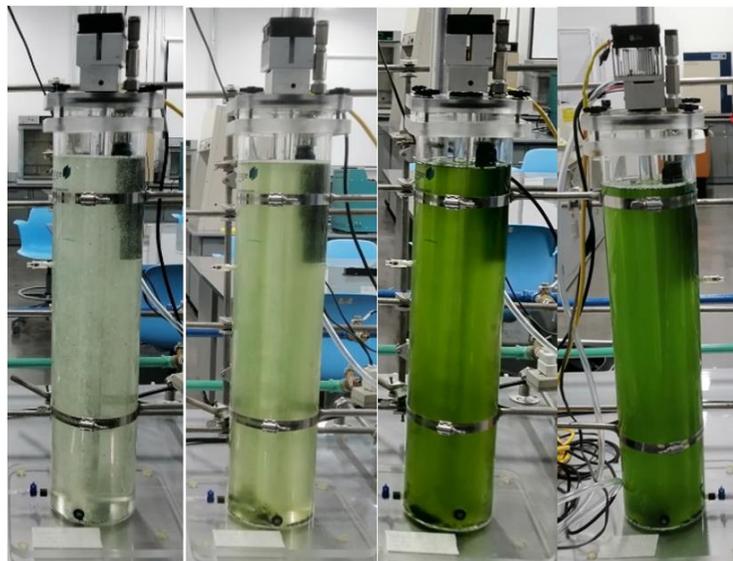
Fuente: Propia. Ubicación: CIT-113, Universidad Del Valle de Guatemala. En el centro puede observarse los fotobiorreactores que cuentan con luces led rojas externas y a los lados de cada uno se observa la caja de control en la que se puede medir la temperatura y pH y se puede controlar el flujo de aire del compresor.

Figura 28. Fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L con 5 L de medio de cultivo f/2 Guillard modificado



Fuente: Propia.

Figura 29. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas *N. oculata* en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00



Fuente: Propia.

Figura 30. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas *N. oculata* en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50



Fuente: Propia.

Figura 31. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas *N. oculata* en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25



Fuente: Propia.

Figura 32. Cambio en el tiempo del cultivo de microalgas *N. oculata* en fotobiorreactores de columna de burbuja ascendente de 8 L a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10



Fuente: Propia.

Figura 33. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00



Fuente: Propia.

Figura 34. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50



Fuente: Propia.

Figura 35. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25



Fuente: Propia.

Figura 36. Biomasa recuperada de la fermentación de microalgas bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10



Fuente: Propia.

Figura 37. Muestras de líquido recuperado de la destilación para la extracción de aceite de la biomasa obtenida en las distintas fermentaciones



Fuente: Propia. Muestra 1 corresponde al aceite vegetal marca ideal utilizado como referencia para análisis de IR. Muestra 2 corresponde a la fermentación x1.00. Muestra 3 corresponde a la fermentación x0.50. Muestra 5 corresponde a la fermentación x0.25. Muestra 5 corresponde a la fermentación x0.10

Figura 38. Líquido con presencia de aceite vegetal recuperado de la destilación para recuperar aceite de la biomasa producida en la fermentación bajo una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00



Fuente: Propia.

Figura 39. Espectro IR del aceite vegetal marca Ideal

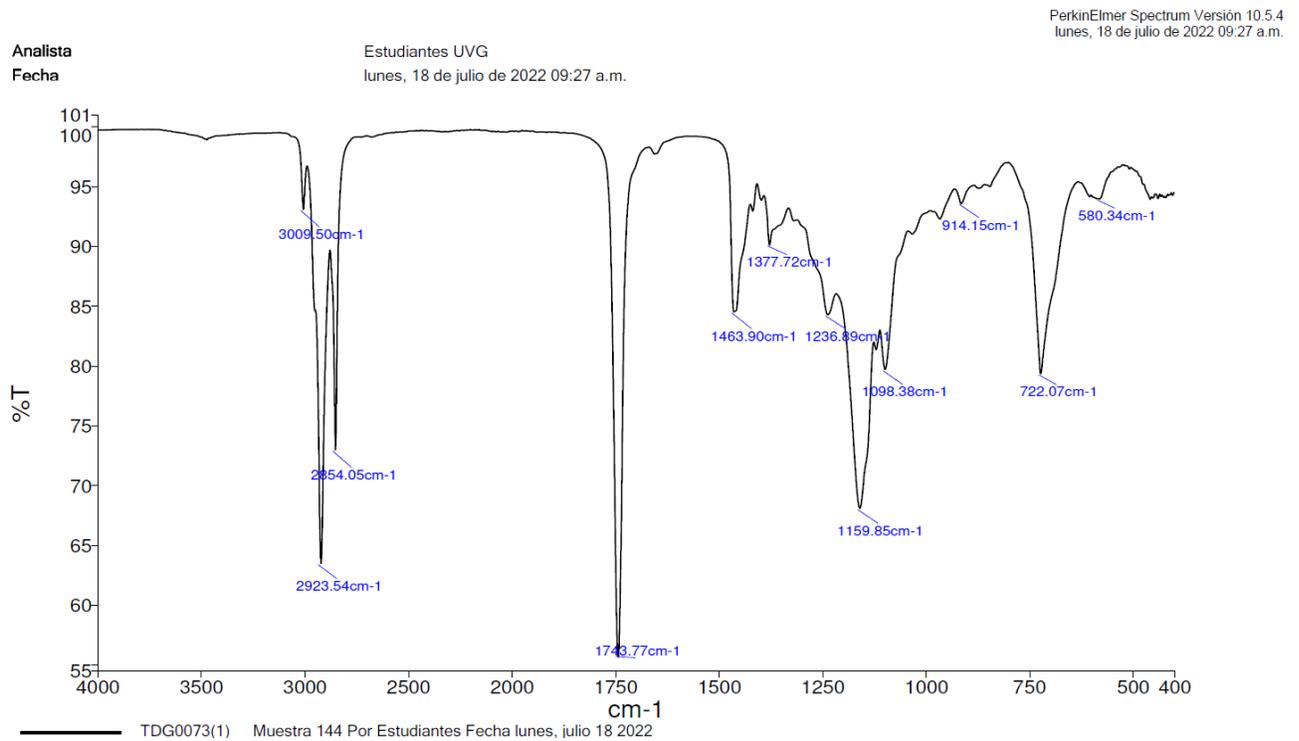


Figura 40. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00

PerkinElmer Spectrum Versión 10.5.4
jueves, 11 de agosto de 2022 01:53 p.m.

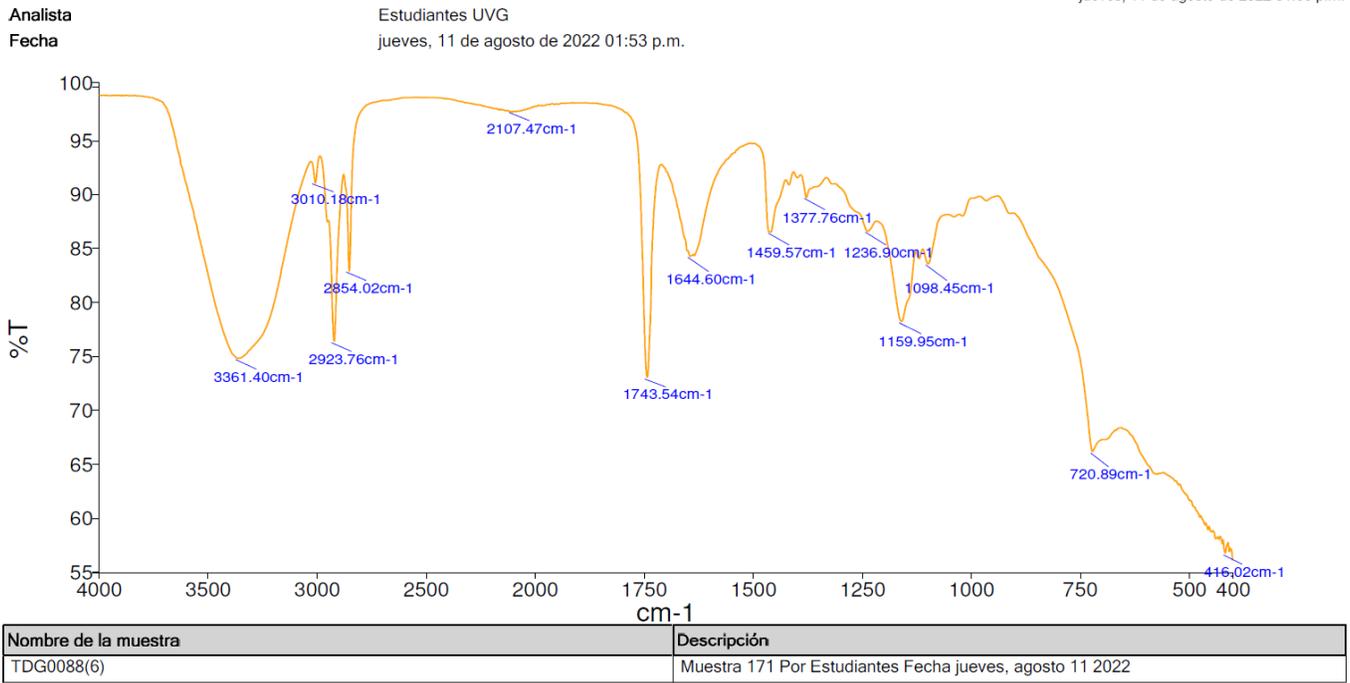


Figura 41. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50

PerkinElmer Spectrum Versión 10.5.4
jueves, 11 de agosto de 2022 01:46 p.m.

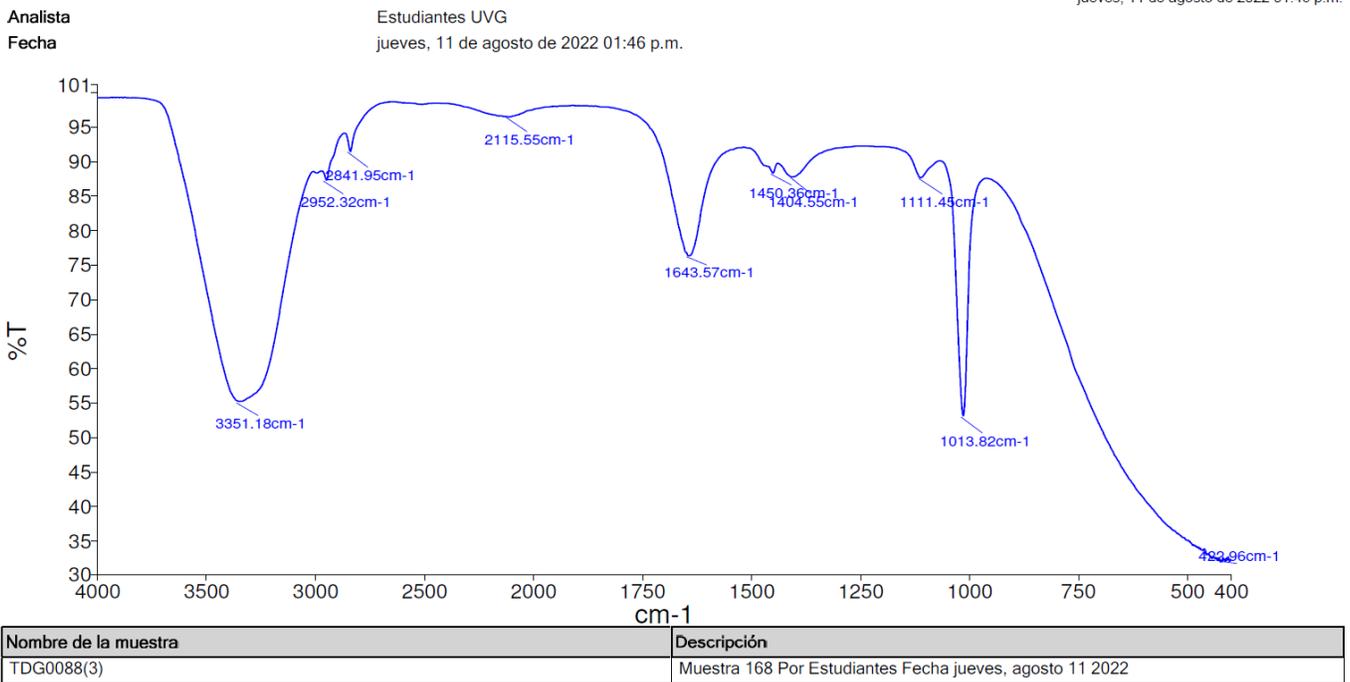


Figura 42. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25

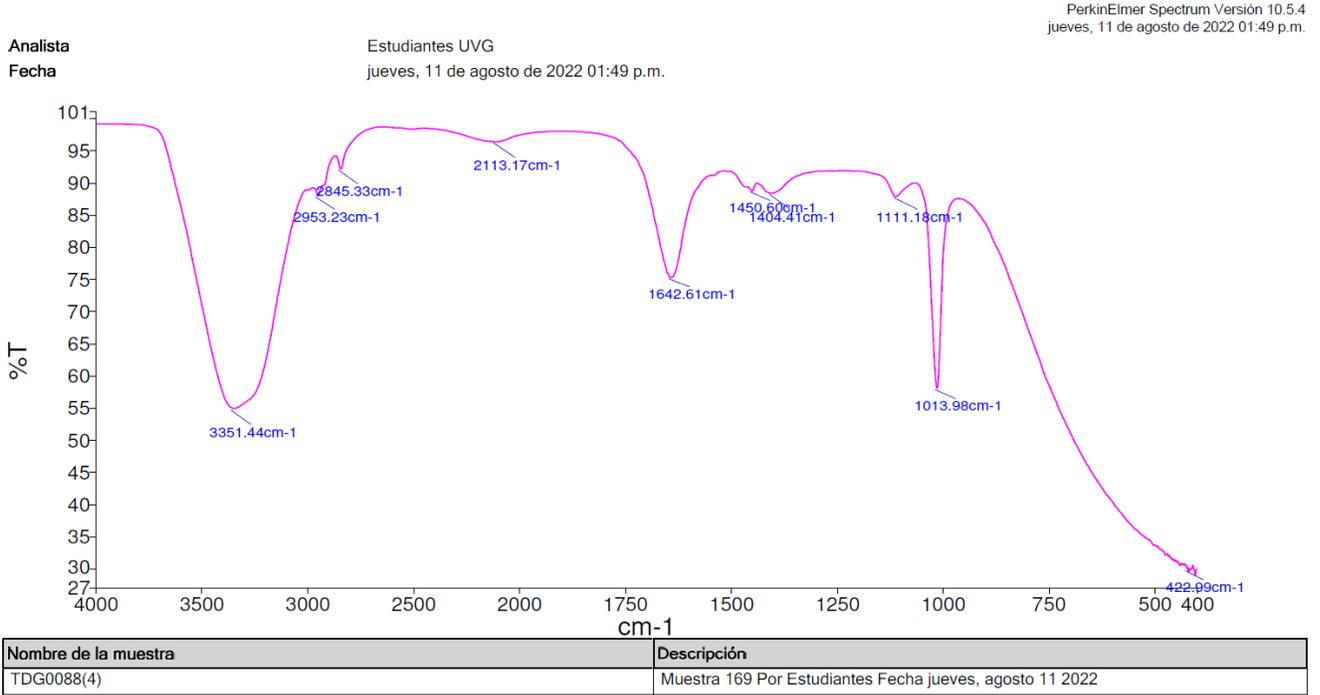


Figura 43. Espectro IR del líquido recuperado de la destilación correspondiente a la producción de microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10

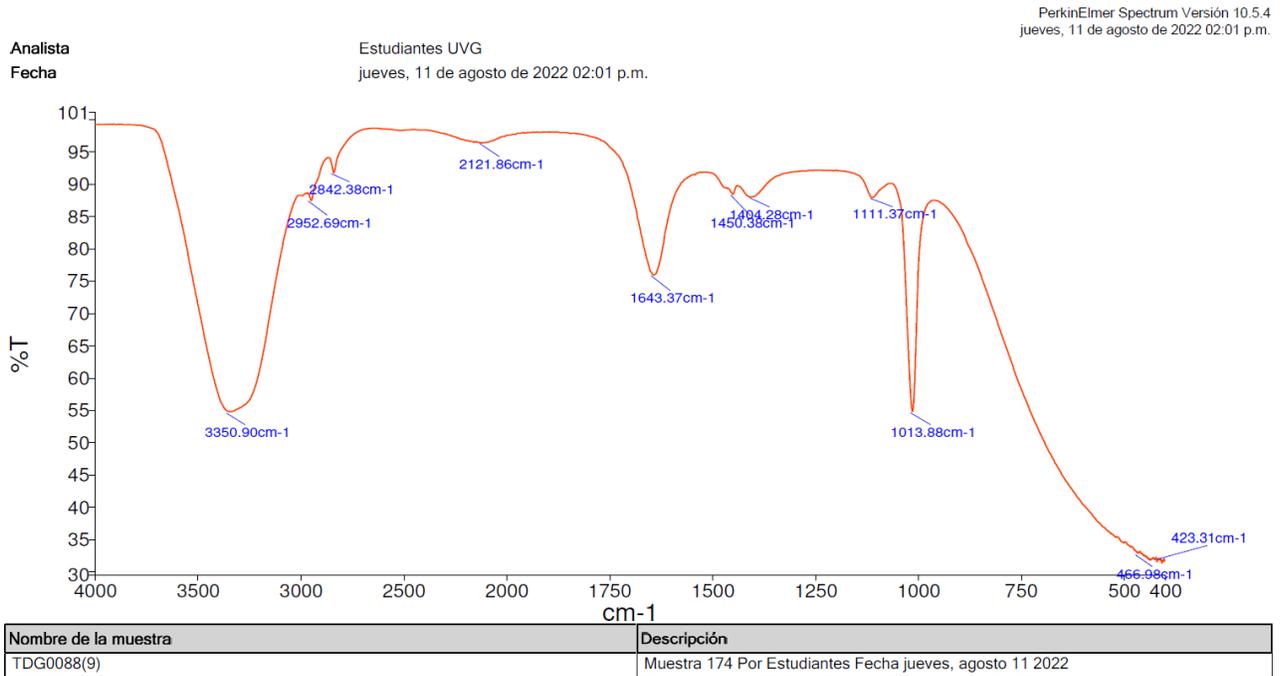
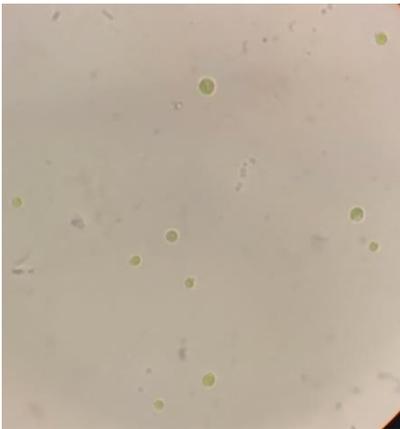


Figura 44. Cultivo de microalgas *N. oculata* sin daño celular observado en el microscopio a 40x



Fuente: Propia.

Figura 45. Perfil de población y viabilidad obtenido con el equipo MUSE para el inóculo 1

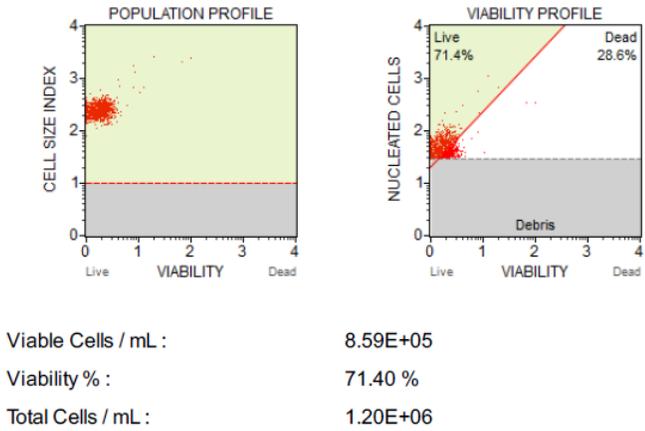


Figura 46. Perfil de población y viabilidad obtenido con el equipo MUSE para el inóculo 2

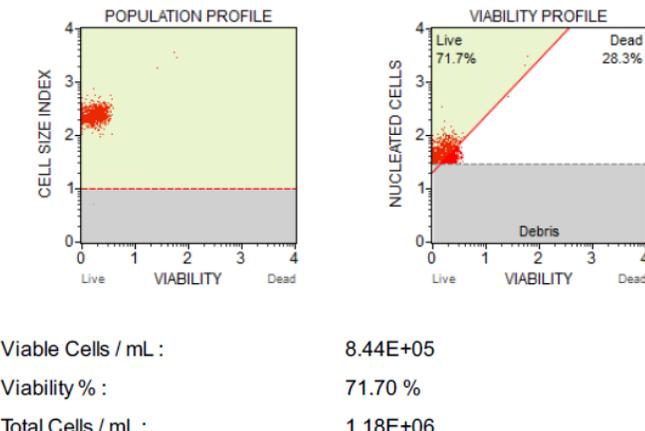
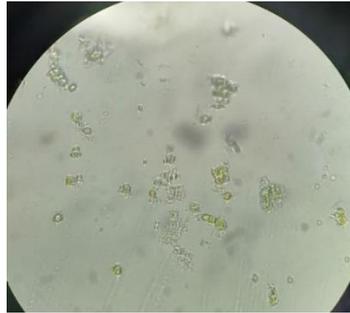
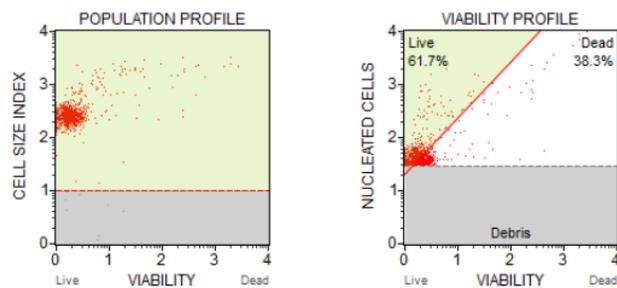


Figura 47. Cultivo de microalgas *N. oculata* observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 15 minutos



Fuente: Propia.

Figura 48. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 15 minutos



Viable Cells / mL :	3.53E+05
Viability % :	61.70 %
Total Cells / mL :	5.72E+05

Figura 49. Cultivo de microalgas *N. oculata* observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 15 minutos



Fuente: Propia.

Figura 50. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 15 minutos

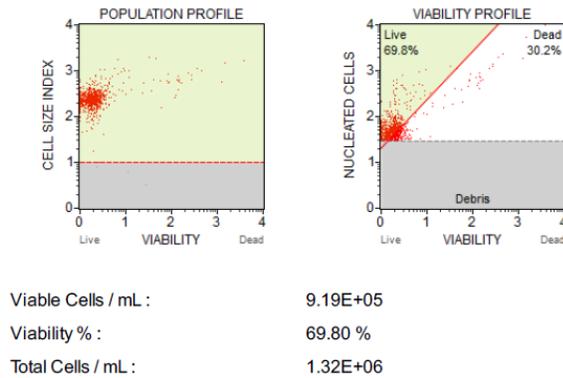
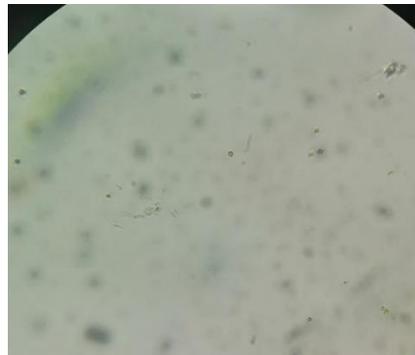


Figura 51. Cultivo de microalgas *N. oculata* observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 15 minutos



Fuente: Propia.

Figura 52. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 15 minutos

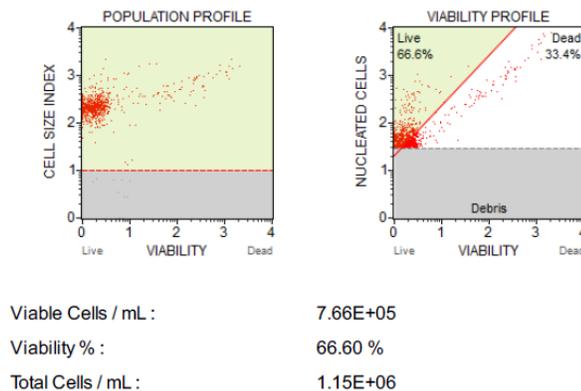
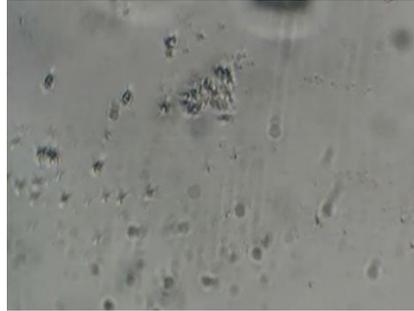


Figura 53. Cultivo de microalgas *N. oculata* observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 15 minutos



Fuente: Propia.

Figura 54. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 15 minutos

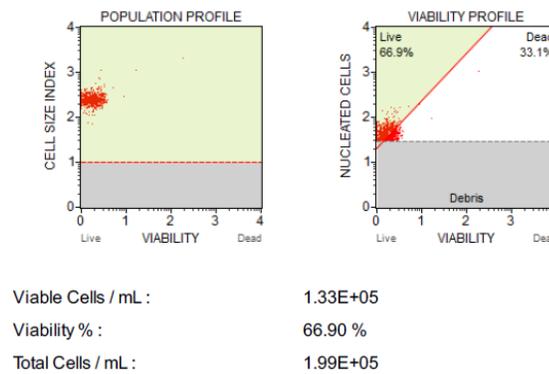
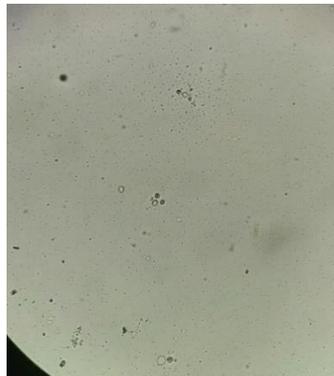


Figura 55. Cultivo de microalgas *N. oculata* observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 7.5 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 7.5 minutos



Fuente: Propia.

Figura 56. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 7.5 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 7.5 minutos

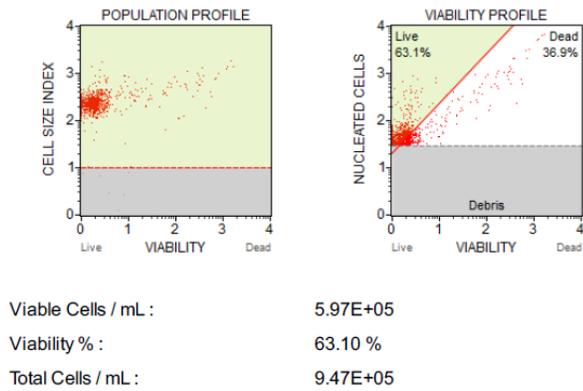
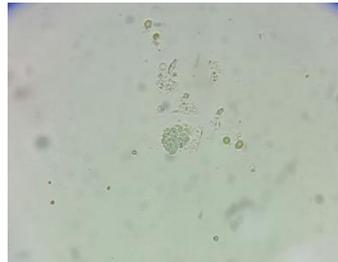


Figura 57. Cultivo de microalgas *N. oculata* observado en el microscopio a 40x posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 15 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 15 min



Fuente: Propia.

Figura 58. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con amplitud de onda del 100% por 15 minutos, seguido de un tratamiento por estrés mecánico inducido por licuadora por 15 min

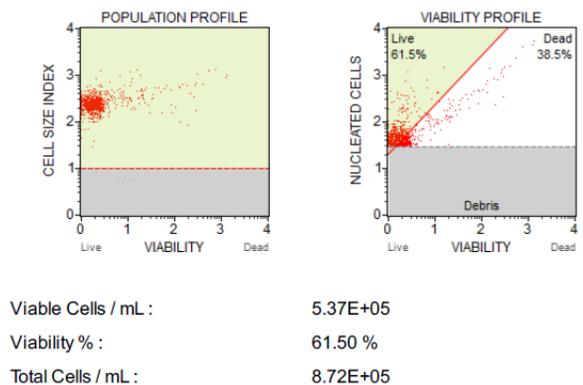


Figura 59. Espectro IR del aceite recuperado con el método de solventes cloroformo:metanol (2:1)

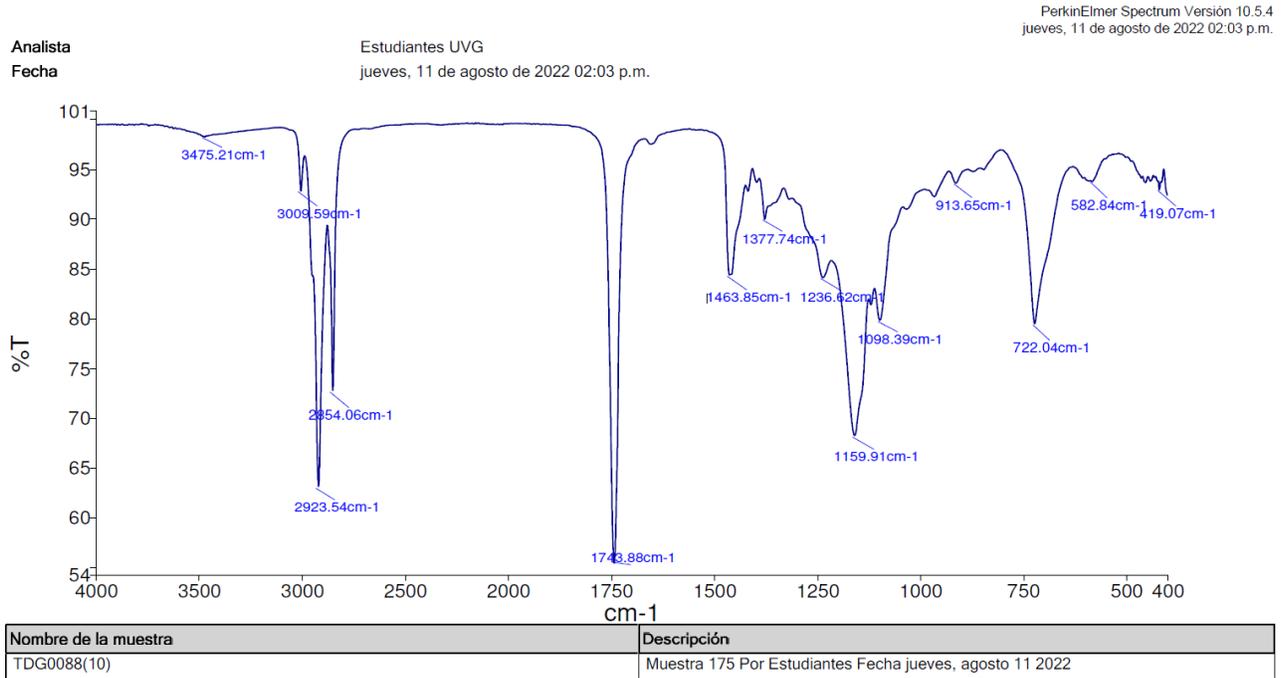


Figura 60. Espectro IR del aceite recuperado con el método de solventes cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1)

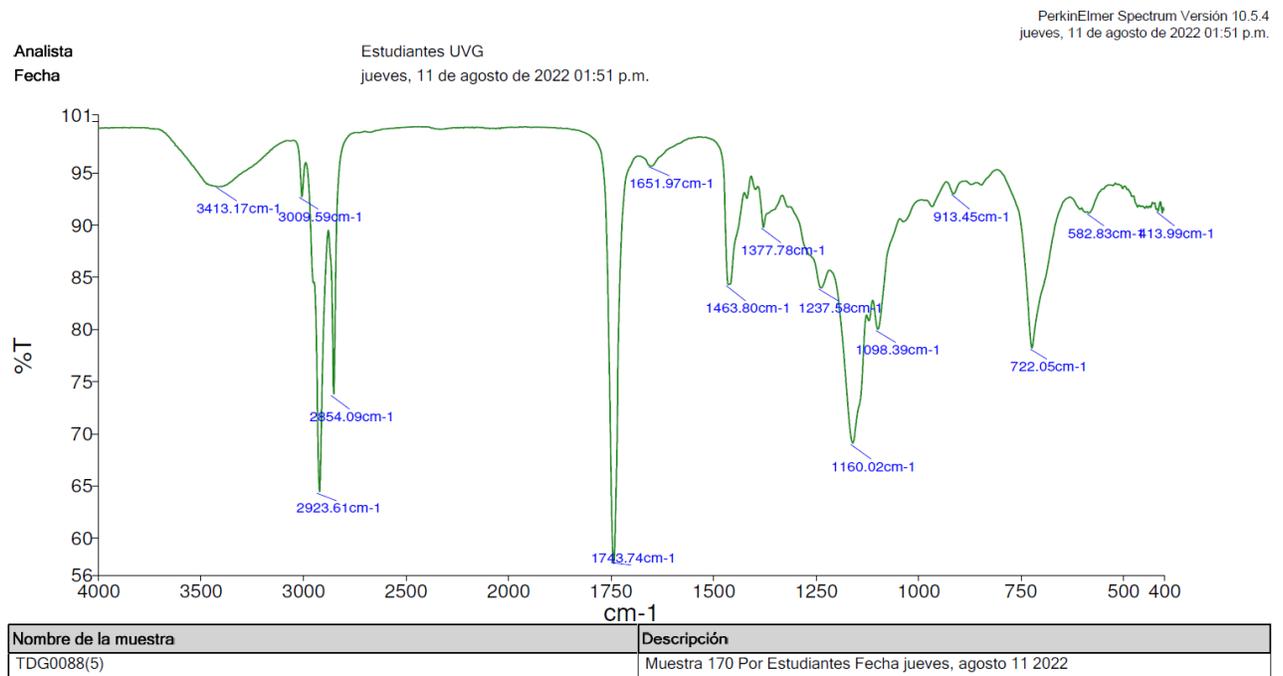


Figura 61. Espectro IR del aceite recuperado con el método de solventes etanol:hexano (1:1)

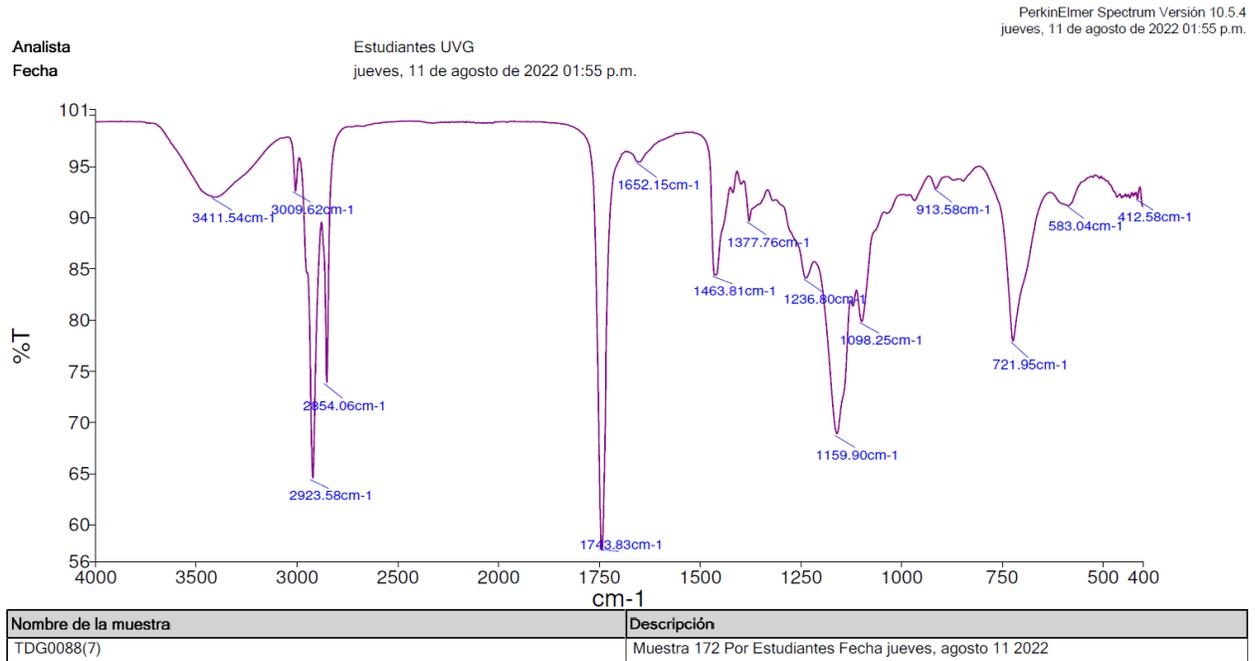


Figura 62. Aceites recuperados con distintos métodos de extracción de aceites con solventes



Fuente: Propia. Muestra 1 corresponde al aceite recuperado con la mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1). Muestra 2 corresponde al aceite recuperado con la mezcla de solventes etanol:hexano (1:1). Muestra 3 corresponde al aceite recuperado con la mezcla de solventes etanol:hexano (1:1). Muestra 2 corresponde al aceite recuperado con la mezcla de solventes cloroformo:metanol:agua (5.7:3:1).

Figura 63. Reactor abierto tipo laguna de la Universidad Del Valle de Guatemala



Fuente: Propia.

Figura 64. Sal de acuario PRODAC



Fuente: Propia.

Figura 65. Sobres NitraVer 5 Nitrate Reagent para la cuantificación de nitratos con el equipo HACH DR 890



Fuente: Propia.

Figura 66. Aceite vegetal marca Ideal



Fuente: Propia.

Figura 67. Barómetro



Fuente: Propia.

Figura 68. Autoclave Tuttnauer



Fuente: Propia.

Figura 69. Equipo MUSE



Fuente: Propia.

Figura 70. Medio de cultivo previo a centrifugación



Fuente: Propia.

Figura 71. Medio de cultivo posterior a la centrifugación



Fuente: Propia.

Figura 72. Centrifuga SORVALL RT7



Fuente: Propia.

Figura 73. Recuperación de biomasa húmeda



Fuente: Propia. En el lado izquierdo se puede observar el medio de cultivo sin biomasa y en el lado derecho la biomasa húmeda recuperada del medio de cultivo.

Figura 74. Secado de biomasa en horno



Fuente: Propia.

Figura 75. Horno secador Symphony



Fuente: Propia.

Figura 76. Lisis celular inducida con estrés mecánico por licuadora de la biomasa recuperada



Fuente: Propia.

Figura 77. Biomasa posterior al tratamiento de lisis celular mezclada con solventes para la extracción de aceite



Fuente: Propia.

Figura 78. Decantación de biomasa en solvente



Fuente: Propia.

Figura 79. Kit de destilación para la recuperación de solventes y aceite



Fuente: Propia.

Figura 80. Muestra de cultivo de microalgas previo a la lisis celular por estrés mecánico con licuadora



Fuente: Propia.

Figura 81. Muestra de cultivo de microalgas posterior a la lisis celular por estrés mecánico con licuadora



Fuente: Propia.

Figura 82. Procesador ultrasónico dr. Hielscher UP100H



Fuente: Propia.

Figura 83. Sistema para realizar lisis celular mediante ultrasonido



Fuente: Propia.

Figura 84. Muestra de microalgas sometida a lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico



Fuente: Propia.

Figura 85. Biomasa seca utilizada en los métodos de extracción de aceite con solventes



Fuente: Propia.

Figura 86. Biomasa seca con aceite vegetal Ideal para la recuperación de aceite con solventes



Fuente: Propia.

Figura 87. Mezcla de biomasa seca y aceite vegetal Ideal con solventes



Fuente: Propia.

Figura 88. Decantación de biomasa seca con aceite vegetal Ideal en solventes



Fuente: Propia.

Figura 89. Kit de destilación para la recuperación de solventes y aceite vegetal Ideal



Fuente: Propia.

Figura 90. Equipo HACH DR890 utilizado para la cuantificación de nitratos en el medio de cultivo



Fuente: Propia.

Figura 91. Medidor salino ATAGO utilizado para cuantificar el porcentaje de salinidad en el medio de cultivo



Fuente: Propia.

Figura 92. Potenciómetro PCS Testr 35 utilizado para medir el pH del medio de cultivo



Fuente: Propia.

Figura 93. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE

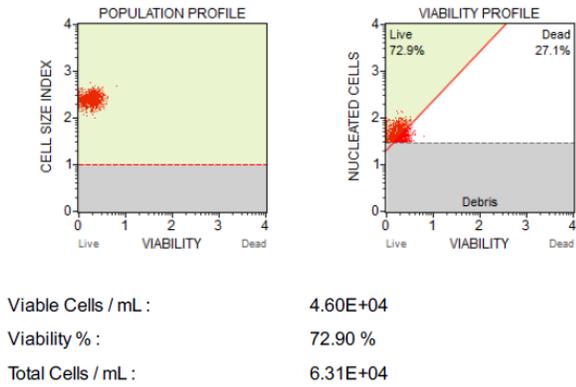


Figura 94. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE

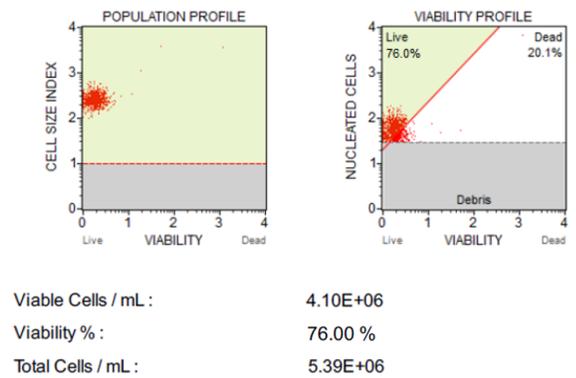


Figura 95. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE

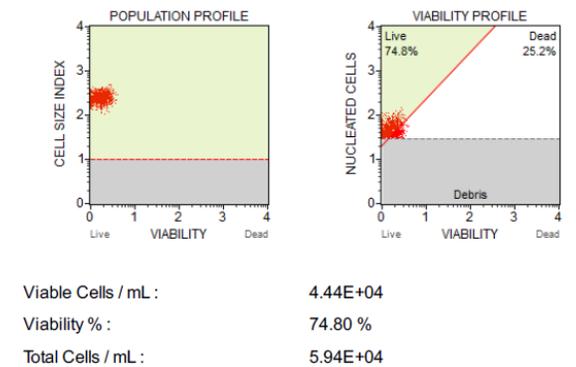


Figura 96. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE

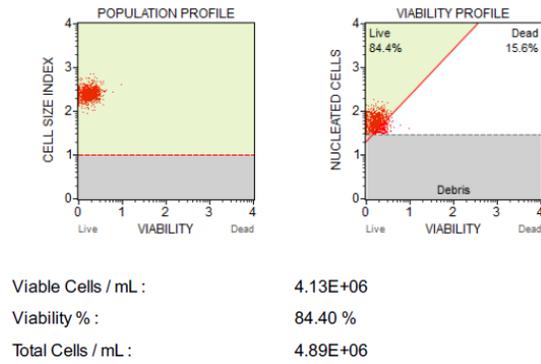


Figura 97. Conteo celular del día 0 de la fermentación 3 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE

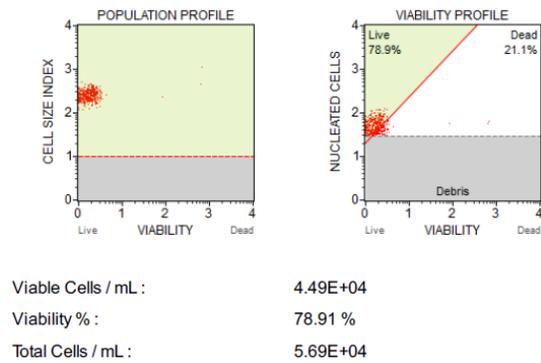


Figura 98. Conteo celular del día 21 de la fermentación 3 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 obtenido con el equipo MUSE

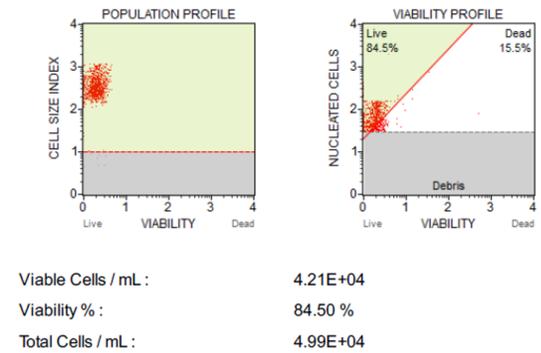


Figura 99. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE

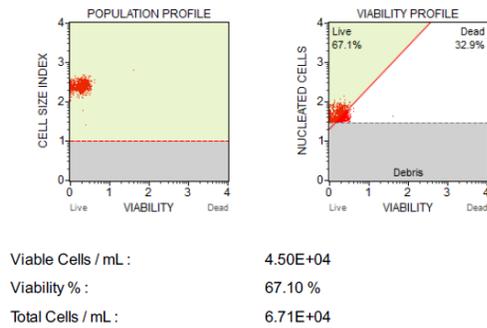


Figura 100. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE

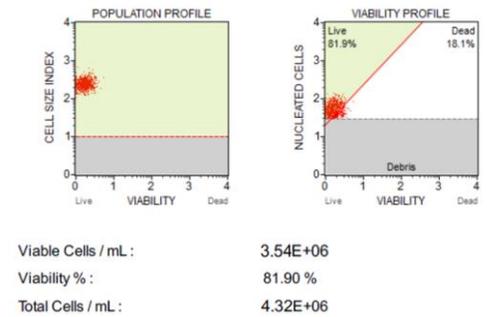


Figura 101. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE

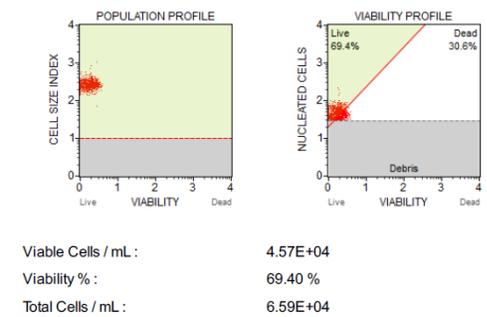


Figura 102. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50 obtenido con el equipo MUSE

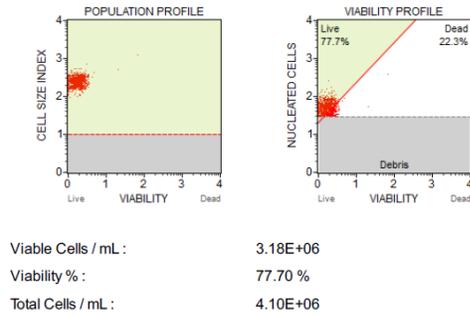


Figura 103. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE

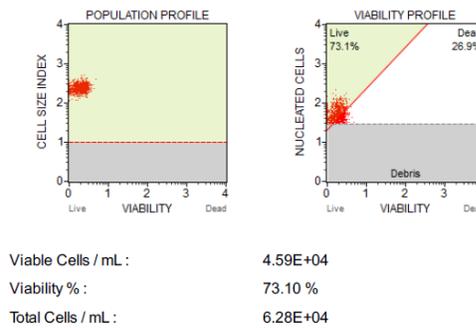


Figura 104. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE

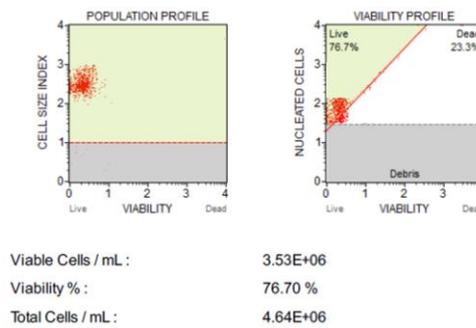


Figura 105. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE

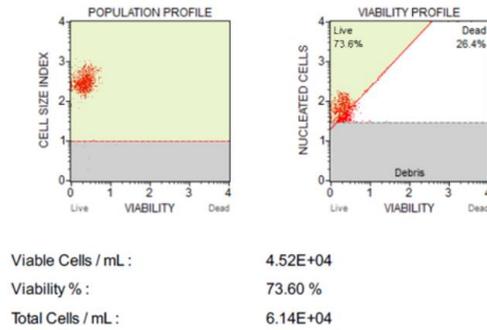


Figura 106. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25 obtenido con el equipo MUSE

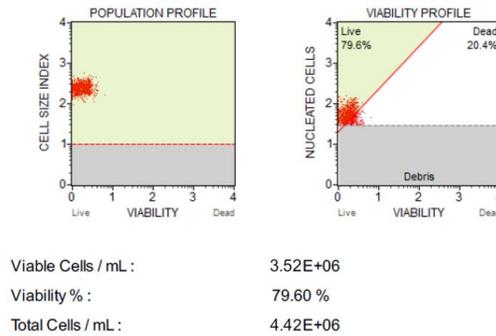


Figura 107. Conteo celular del día 0 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE

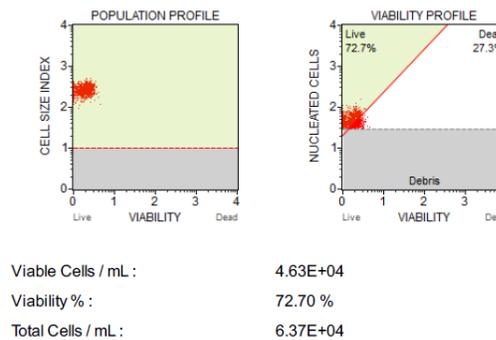


Figura 108. Conteo celular del día 21 de la fermentación 1 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE

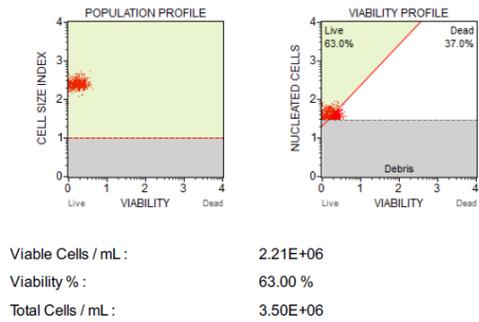


Figura 109. Conteo celular del día 0 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE

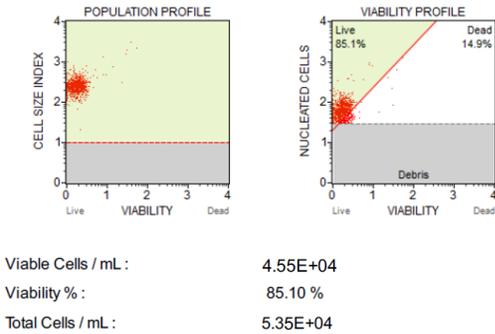


Figura 110. Conteo celular del día 21 de la fermentación 2 a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 obtenido con el equipo MUSE

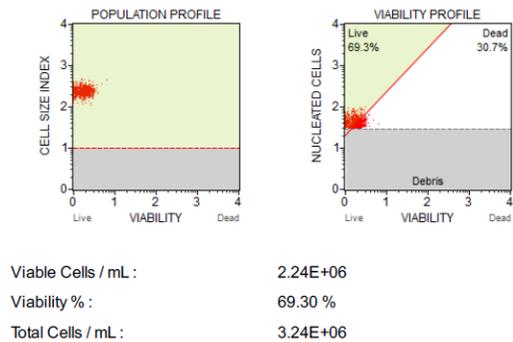


Figura 111. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 5 minutos

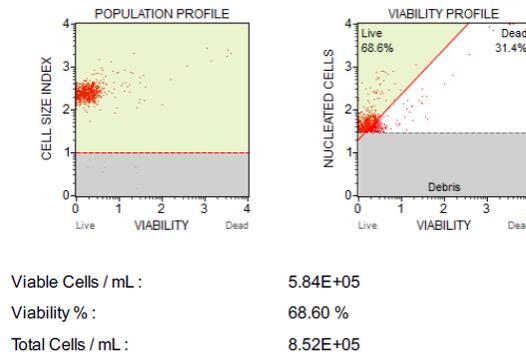


Figura 112. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por estrés mecánico utilizando una licuadora por 10 minutos

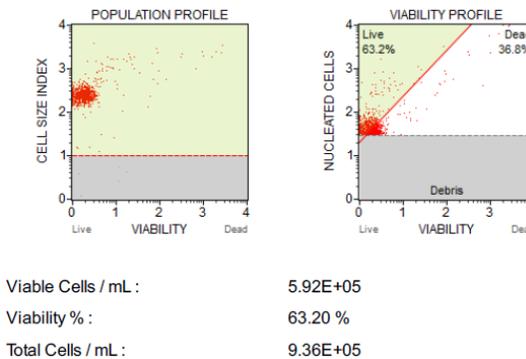


Figura 113. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 5 minutos

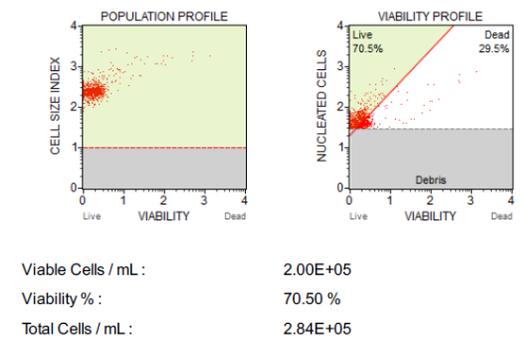


Figura 114. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 50% por 10 minutos

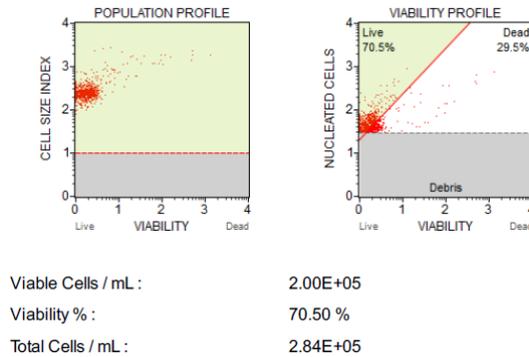


Figura 115. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 5 minutos

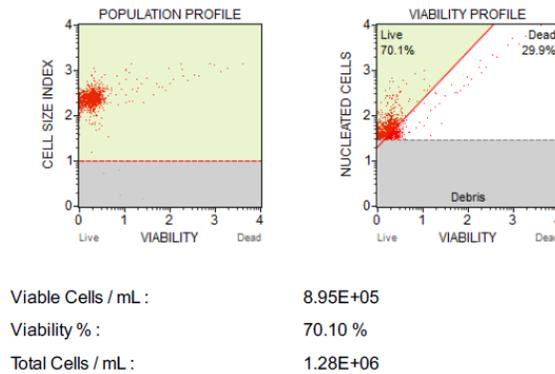


Figura 116. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por ultrasonido con una amplitud de onda del 100% por 10 minutos

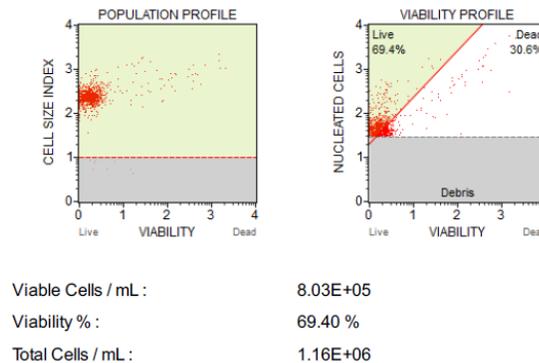


Figura 117. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 5 minutos

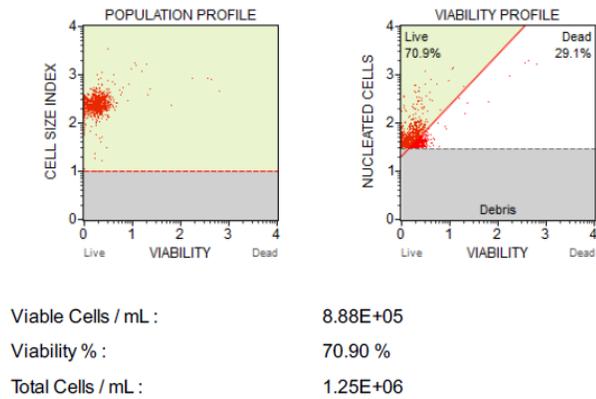
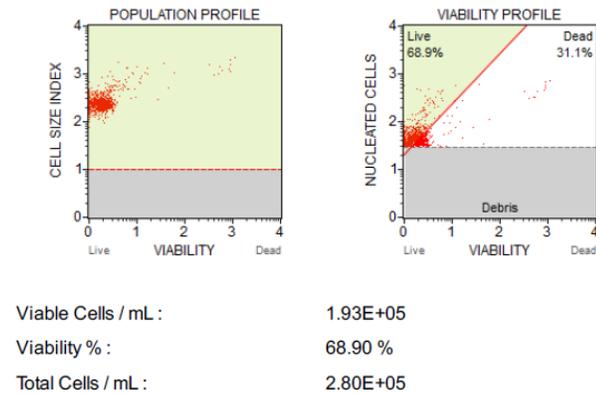
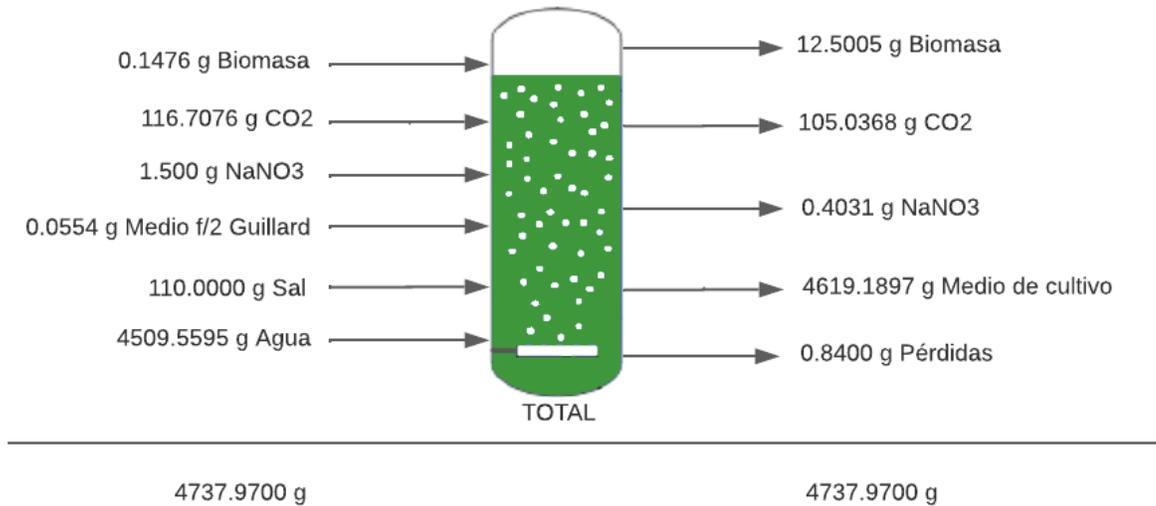


Figura 118. Perfil de población y viabilidad, obtenido con el equipo MUSE, de la muestra 1 de las microalgas *N. oculata* posterior a un tratamiento de lisis celular por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 1 M por 10 minutos



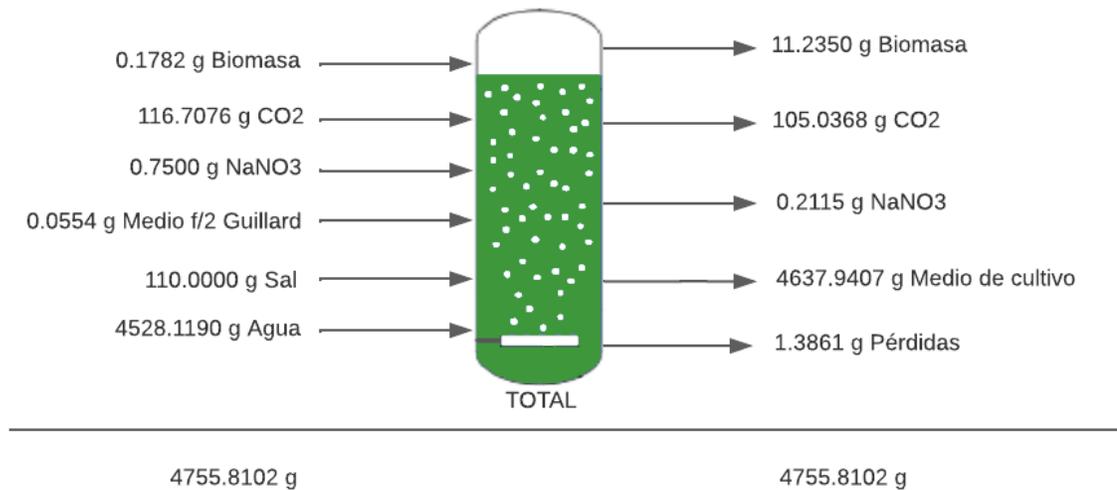
E. BALANCES DE MASA DE LOS SISTEMAS FERMENTATIVOS

Figura 119. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.



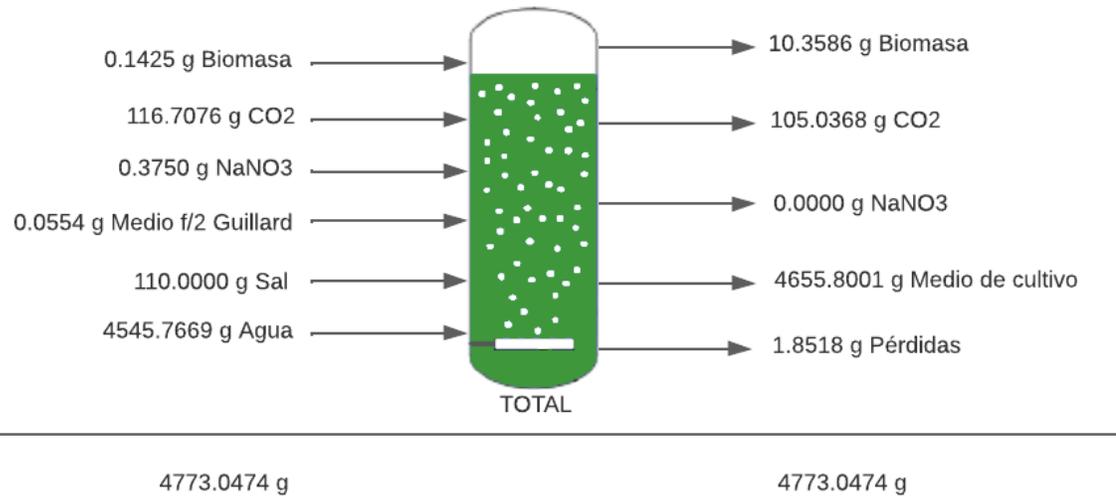
*Se asumió un 10% de fijación del CO₂ y un consumo del 40% del medio f/2 Guillard

Figura 120. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.50



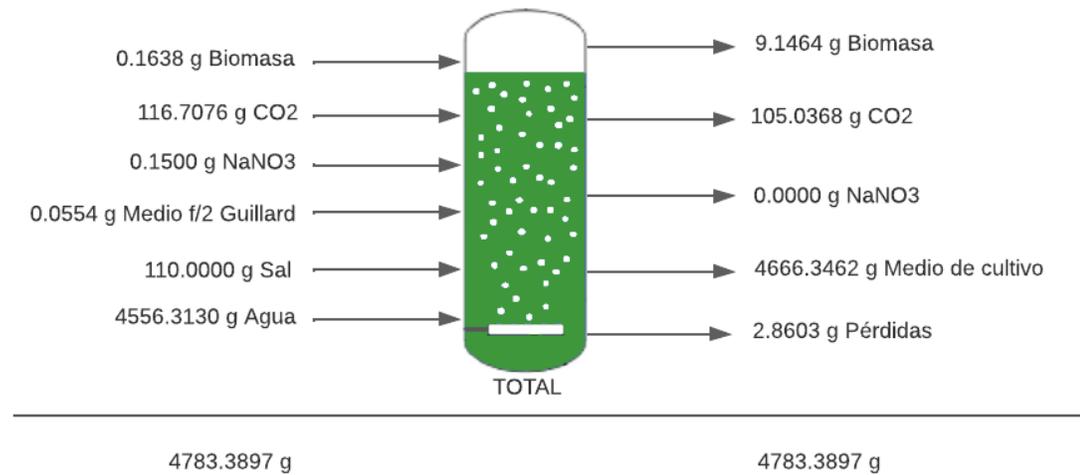
*Se asumió un 10% de fijación del CO₂ y un consumo del 40% del medio f/2 Guillard

Figura 121. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.25



*Se asumió un 10% de fijación del CO₂ y un consumo del 40% del medio f/2 Guillard

Figura 122. Balance de masa para el sistema fermentativo con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10



*Se asumió un 10% de fijación del CO₂ y un consumo del 40% del medio f/2 Guillard

F. GLOSARIO

Algaenano: Polímero alifático, insoluble, no hidrolizable y muy resistente, que es responsable en gran parte de la dureza de la pared celular de las microalgas. Se conforma por cadenas rectas de hasta 30 carbonos, altamente saturadas y unidas por enlaces éter en la posición terminal y en una o dos posiciones de la cadena media.

Biocombustible: Biocombustible derivado de materia orgánica o biomasa, la cual se genera a partir de procesos biológicos. Es un tipo de combustible renovable y presenta la ventaja de generar menos gases de efecto invernadero en comparación con otros tipos de combustibles.

Cámara de Neubauer: Instrumento ampliamente utilizado en biología para realizar conteos celulares o de esporas, presentes en un medio de cultivo. Cuenta con divisiones por cuadrantes que permiten el conteo utilizando un microscopio.

Clorofila: Pigmento de color verde que puede encontrarse en los cloroplastos de las microalgas. Además, es indispensable en el proceso de fotosíntesis para que las microalgas pueden obtener energía a partir de la luz solar y la fijación de dióxido de carbono.

Espacio-Tiempo: Es el tiempo requerido para tratar un volumen de fluido igual al volumen del reactor a las condiciones de entrada.

Fotobiorreactor: Sistema diseñado para el cultivo de microorganismos fotoautótrofos. Está conformado por una fuente de luz artificial para facilitar la fotosíntesis de dichos microorganismos. Además, brinda las ventajas de poder controlar todo el ambiente de cultivo.

Lisis celular: Es el proceso en el que la membrana celular y/o la pared celular de un microorganismo se rompe, permitiendo la expulsión de todo el material intracelular. Esto puede ser provocado por factores externos que lesionan la membrana celular y/o la pared celular hasta romperlas.

Microalgas: Microorganismos eucariotas fotosintéticos que aprovechan la luz solar y fijan dióxido de carbono para producir biomasa. Pueden encontrarse en aguas saladas y dulces.

Modelo de Droop: Modelo matemático que describe el crecimiento celular de las microalgas y considera la acumulación del producto de interés en el interior celular.

Velocidad específica de crecimiento celular: Es la velocidad a la cual una célula se reproduce para obtener una nueva generación.

Viabilidad celular: Característica que permite evaluar la capacidad de una célula sana para reproducirse y que cuenta con una buena integridad de su membrana celular y/o pared celular.