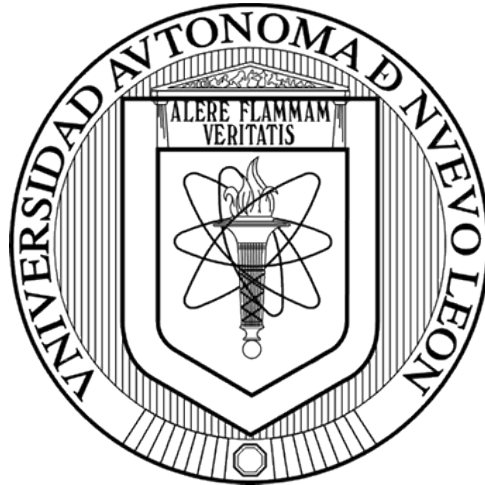


Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ingeniería Civil



ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL
CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES BR-
UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO_3^- Y PO_4^{3-}
EN EFLUENTES SECUNDARIOS

Por:

Edwin Alexis Fariz Salinas

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN INGENIERÍA con orientación en
INGENIERIA AMBIENTAL

NOVIEMBRE de 2023



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

2023/04/27

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.

Estimado Dr. Fajardo San Miguel

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, denominado "**ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES BR-UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO_3^- Y PO_4^{3-} EN EFLUENTES SECUNDARIOS**", que presenta el **M. C. EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS**, como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN INGENIERÍA**, del programa **DOCTORADO EN INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente

Alere Flammas Veritatis

San Nicolás de los Garza Nuevo León a 27 de abril de 2023


DR. BENJAMÍN LIMÓN RODRÍGUEZ
Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455
81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

FECHA: 2023/ABRIL/26

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES BR-UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO_3^- Y PO_4^{3-} EN EFLUENTES SECUNDARIOS"**, que presenta el **M. C. EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS**, como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN INGENIERÍA**, del programa **DOCTORADO EN INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto. Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dr. Ulrico J. López Chuken
Profesor-Investigador, FCQ, UANL

C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, N.L.
ulrico.lopezchk@uanl.edu.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



FECHA: 2023/04/13

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **“ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES BR-UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO_3^- Y PO_4^{3-} EN EFLUENTES SECUNDARIOS”**, que presenta el M. C. **EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS**, como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN INGENIERÍA**, del programa **DOCTORADO EN INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dr. Julio César Beltrán Rocha
Evaluador



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 30/Octubre/2023.

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES BR-UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO_3^- Y PO_4^{3-} EN EFLUENTES SECUNDARIOS"**, que presenta el **M. C. EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS**, como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN INGENIERÍA**, del programa **DOCTORADO EN INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictaminó que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dr. Arquimedes Cruz López

Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455
81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 2023/11/07

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,


Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES BR-UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO_3^- Y PO_4^{3-} EN EFLUENTES SECUNDARIOS"**, que presenta el **M. C. EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS**, como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN INGENIERÍA**, del programa **DOCTORADO EN INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictaminó que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,


Digitally signed by Dr. Carlos Joel Abrago Góngora
DN: cn=Dr. Carlos Joel Abrago Góngora,
o=Universidad Autónoma de Nuevo León,
ou=Facultad de Ingeniería Civil,
email=carlos.abrago@uanl.edu.mx,
c=MX
Date: 2023.11.07 12:45:30 -06'00'

Evaluator



Av. Universidad S/N Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P.66455
Tels. (81) 14424400 ext. 4448 | 83294000 ext. 7216, 7234
correo electrónico: spi.fic@uanl.mx



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Comprobante de corrección de escritos

ESTUDIANTE PROFESOR

NOMBRE: EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS

TIPO DE DOCUMENTO: ARTÍCULO TESIS PI OTRO

TÍTULO DEL DOCUMENTO A REVISAR:
ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR
EL CONSORCIO DE MICROALGAS FLOCULANTES
BR-UANL-01, ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE NO₃YPO₄³⁻
EN EFLUENTES SECUNDARIOS

RECOMENDACIONES ADICIONALES:

REALIZAR LAS CORRECCIONES QUE APAREZCAN
EN LA TESIS IMPRESA

*Este documento certifica la corrección DEFINITIVA del trabajo arriba identificado, en los aspectos: ortográfico, metodológico y estilístico.

Nombre y firma de quien corrigió:

Ramongoria

Arq. Ramon Longoria Ramirez
Asesor Profesional de Apoyo

[Signature]

Dr. Gerardo Fajardo San Miguel

Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación
Ciudad Universitaria, 29 de octubre de 2023



SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Av. Universidad S/N Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P.P. 66455
Tels. (81) 14424400 ext. 4448 | 83294000 ext. 7216, 7234
correo electrónico: spi.fic@uanl.mx

Código: FOR-SPI-14; Revisión: 01; Página 1 de 1

**ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR EL CONSORCIO DE
MICROALGAS FLOCULANTES BR-UANL-01 ASOCIADA A LA REMOCIÓN DE
NO₃⁻ Y PO₄³⁻ EN EFLUENTES SECUNDARIOS**

Aprobación de la tesis

DR. BENJAMÍN LIMÓN RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUKEN

CODIRECTOR

DR. JULIO CÉSAR BELTRÁN ROCHA

EVALUADOR

DR. ARQUÍMEDES CRUZ LÓPEZ

EVALUADOR

DR. CARLOS JOEL ÁBREGO GÓNGORA

EVALUADOR

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Agradecimientos

En los siguientes párrafos quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que con su aporte humano, técnico y científico colaboraron en el desarrollo de esta investigación.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada, al Instituto de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería Civil (FIC) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), al departamento de Ingeniería Ambiental, al departamento de Ecomateriales y energía, al laboratorio de Fisicoquímica y al laboratorio de Servicio al Público por brindar las facilidades de utilizar sus equipos analíticos, instalaciones, materiales y reactivos para alcanzar los objetivos específicos de esta investigación.

A mis asesores, el Dr. Benjamín Limón Rodríguez y el Dr. Javier Ulrico López Chuken, por la confianza, la acertada orientación, el apoyo y la discusión crítica necesaria, que concluyó en el buen desarrollo de este proyecto. También quiero agradecer a los miembros del Comité Tutorial por sus comentarios y consejos que siempre fueron en pro de enriquecer el proyecto. De igual forma quiero agradecer la orientación y el apoyo brindado por el Dr. Carlos Castillo Zacarías y el Dr. Carlos Ábrego Góngora.

Quiero agradecer también a mis amigos: Lirio, Fátima, Kevin, Arantxa, Mercedes, Sebastián y Julián, quienes estuvieron conmigo a lo largo de este camino en diferentes etapas del viaje, gracias por su amistad y compañerismo, sobre todo, gracias por hacer más amena esta travesía.

A la gran familia veracruzana que tengo en monterrey los quiero mucho chicos, a mis mejores amigos en la vida Martha, Valeria, Michael, Mónica, Jesús y Franco les amo y gracias por estar en mi vida.

Por supuesto, quiero agradecer a mi familia por su comprensión, palabras de aliento, motivación, comunicación constante y principalmente por ser un faro de luz en los momentos de mayor oscuridad, ya que este camino fue más largo y difícil que el anterior, y ustedes siempre han estado ahí para apoyarme, GRACIAS.

Finalmente, no hay palabras que expresen todo el agradecimiento y admiración hacia la persona que motivó el comienzo de este camino de la investigación y las ciencias, quién creyó en mí desde el comienzo, a quien con cariño puedo llamar mi madre científica, Dra. Areli, gracias por ese primer acercamiento a este mundo que hoy puedo ver como propio, un abrazo y un beso hasta el cielo, mis compañeras de proyecto y yo, la llevaremos siempre en nuestros pensamientos y en nuestro corazón.

Dedicatoria:

A mis padres, por su gran apoyo incondicional y motivación para continuar superándome día con día, logrando ser el profesional que hoy soy.

A Ximena, Ramiro y Erick de Jesús, por ser de las motivaciones más grandes en mi vida, empujándome a ser mejor siempre, para contribuir en mejorar el planeta que les dejo.

Gracias por todo, ya que se volvió realidad lo inimaginable.

Resumen

Debido al riesgo a la salud que presenta el consumo de pigmentos artificiales y en respuesta a las exigencias del mercado, la demanda por pigmentos de origen natural ha incrementado. A razón de esto último, se han propuesto alternativas que involucran la extracción de pigmentos a partir de microorganismos como las microalgas, las cuales a la par de generar pigmentos y otros productos de alto valor comercial, son capaces de mineralizar algunos contaminantes del agua. En esta investigación se utilizaron variables de iluminación con el objetivo de incrementar las concentraciones de luteína en el consorcio de microalgas floculantes BR-UANL-01 y, a su vez mineralizar nutrientes contaminantes de un efluente tratado usado como medio de cultivo, y con las mejores condiciones de iluminación encontradas, escalar fotobiorreactores a nivel semipiloto para incrementar la generación de biomasa, la concentración de luteína y la mineralización de contaminantes (Nitrógeno y Fosforo). Durante el diseño de experimentos no se identificaron condiciones para el aumento de luteína, sin embargo, las mejores condiciones encontradas para el incremento de biomasa fueron: intensidad de 5W; fotoperiodos de 12/12 h L/O y luz fría. Con estas condiciones se incrementó la concentración de biomasa pasando de 1.44 g a 237.75 g en la etapa de escalado y al final de la etapa de inducción de estrés, generando un total de 59.43 mg de luteína. Respecto a la mineralización de nutrientes contaminantes, se observó una asimilación del 95.5% y 99% del NO_3^- en las etapas de diseño de experimentos e inducción de estrés respectivamente, así como un 99% de PO_4^{3-} en ambas etapas. Esto debido a que estos nutrientes contaminantes están involucrados directamente en procesos metabólicos, como la replicación celular y la asimilación del CO_2 atmosférico para la generación de energía. Los resultados obtenidos sugieren que el aumento en la biomasa del consorcio BR-UANL-01, se debe a las variaciones en los parámetros de iluminación. Así mismo, esta investigación ofrece una visión del comportamiento del consorcio BR-UANL-01, en condiciones de estrés lumínico y se corrobora el papel que la iluminación tiene en el metabolismo de los nutrientes y la generación de pigmentos.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS USADOS

°C grados Celsius	GGPP Geranylgeranyl pirofosfato
µm Micrómetros	Glu Glutamato
ADP Adenosín Difosfato	GRASS Generally Recognized as Safe (Productos generalmente reconocidos como seguros)
ANOVA Análisis de Varianza	h Horas
ART Agua residual tratada	K Grados Kelvin
ATP Adenosín Trifosfato	L Litros
BHY β-caroteno hidrolasa	L:O Luz: Oscuridad
BKT β-caroteno cetolasa	LCY-B Licopeno β-ciclasa
Ca Calcio	LCY-E Licopeno ε-ciclasa
CFR Código de Regulaciones Federales	LED Diodo emisor de luz
Chl Clorofila	lm Lumen
cm centímetros	m Metros
CO ₂ Dióxido de Carbono	MDD Millones de dólares
COFEPRIS Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios	Mg Magnesio
COVID-19 Enfermedad infecciosa provocada por el virus SARS-CoV-2	mg/g Miligramos sobre gramo
DOE Diseño de Experimentos	mg/kg Miligramos sobre kilogramo
DQO Demanda Química de Oxígeno	mg/L/d Miligramos sobre litro sobre día
EFSA European Food Safety	min Minutos
EHY ε-caroteno hidroxilasa	mL Mililitros
FAO Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura)	mL/L Mililitros sobre litro
Fd Ferredoxina	mL/min Mililitros sobre minuto
FDA Food and Drug Administration	mm Milímetros
g/L gramos sobre litros	MMDD Mil millones de dólares
	N Nitrógeno

NADH Nicotinamida adenina dinucleótido	PSI Libra fuerza sobre pulgada cuadrada
NH ₄ Amoniaco	PSII Fotosistema II
nm Nanómetros	PSY Fitoeno sintetasa
NO ₂ Nitrito	PTAR Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
NO ₃ ⁻ Nitrato	SST Sólidos Suspendidos Totales
NOM Normas Oficiales Mexicanas	UE Unión Europea
ODS Objetivos de Desarrollo Sostenible	UV Ultravioleta
OH ⁻ Ion Hidroxilo	V/V Volumen sobre volumen
P Fósforo	VVM Volumen por volumen por minuto
PAV Productos de Alto Valor	W Watt
PDS ζ-caroteno desaturasa	WHO World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
pH Potencial de hidrógeno	XX Veinte
PO ₄ ³⁻ Fosfato	μL Microlitros
PROFECO Procuraduría Federal del Consumidor	μmoles m ⁻² s ⁻¹ Micromoles sobre metro cuadrado por segundo
PSI Fotosistema I	

Índice

Capítulo I INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Justificación	2
CAPÍTULO II ANTECEDENTES.....	4
2.1 Colorantes y aditivos	4
2.1.1 Clasificación de los colorantes y los aditivos.....	5
2.1.2 Toxicidad de los pigmentos sintéticos.....	6
2.2 Regulaciones para el uso de pigmentos sintéticos.....	8
2.3 Luteína.....	11
2.3.1 Mercado de luteína a nivel global.....	12
2.4 Microalgas	12
2.4.1 Tratamiento de aguas con microalgas	13
2.4.2 Síntesis de Productos de Alto Valor (PAV)	14
2.4.3 Consorcio de Microalgas BR-UANL-01	16
2.5 Fotobiorreactores	17
2.6 Escalamiento.....	19
CAPÍTULO III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
3.1 Hipótesis.....	21
3.2 Objetivos.....	21
3.2.1 Objetivo general.	21
3.2.2 Objetivos específicos.....	21
3.3 Aportación científica	22
CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1 Área de Trabajo.	23
4.2 Plan de Trabajo del Proyecto de Investigación	23
4.3 Consorcio y pre-cultivo	24
4.4 Determinación de la concentración de biomasa	25
4.4.1 Peso seco	25
4.4.2 Relación biomasa medio de crecimiento	25
4.5 Porcentaje de floculación.....	25
4.6 Operación de fotobiorreactores en condiciones de estrés lumínico	26

4.7 Extracción de pigmentos	28
4.8 Análisis UHPLC	29
4.9 Diseño de experimentos y análisis estadístico.....	29
4.10 Escalamiento.....	30
4.10.1 Construcción.....	30
4.10.2 Operación	31
4.10.3 Cinética de crecimiento	32
CAPÍTULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Reactivación del Consorcio BR-UANL-01	33
5.1.1 Monitoreo de parámetros (Reactivación)	33
5.2 Diseño de Experimentos (DOE).....	37
5.2.1 Monitoreo de parámetros (DOE).....	38
5.2.2 Determinación de iones de nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}).....	40
5.2.3 Extracción de luteína, análisis cromatográfico e incremento de biomasa.....	42
5.2.4 Análisis estadístico	46
5.3 Escalamiento.....	49
5.3.1 Construcción de fotobiorreactores.....	49
5.3.2 Monitoreo de los parámetros durante el escalado e inducción de estrés	50
5.3.3 Determinación de iones de nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}) en escalamiento ..	54
5.3.4 Acumulación de luteína e incremento de biomasa	58
5.4 Perspectivas a futuro para el aprovechamiento de biomasa de microalgas.....	62
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
Conclusiones.....	65
Recomendaciones	66
CAPÍTULO VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
Anexos	75
Anexo 1	75
Análisis de Varianza Biomasa.....	75
Anexo 2	77
Análisis de Varianza Concentración de Luteína.....	77
Anexo 3	79
Prueba de Kruskal Wallis	79

Lista de tablas

Materiales y Métodos	
Tabla 4.1 Características del agua residual tratada	27
Tabla 4.2 Resumen del diseño de experimentos factorial completo 2^3	29
Tabla 4.3 Condiciones utilizadas durante el escalado e inducción de estrés	32
Resultados y Discusión	
Tabla 5.1 Remoción de PO_4^{3-} y NO_3^-	40
Tabla 5.2 Resultados de concentración de luteína e incremento de biomasa en el DOE	43
Tabla 5.3 Concentración, porcentaje de remoción, rendimiento y tasa de remoción de contaminantes en el escalamiento e inducción de estrés	55
Tabla 5.4 Valores de biomasa obtenidos en cada fase del escalamiento e inducción de estrés	61

Lista de figuras

Antecedentes	
Figura 2.1 Estructura de la luteína (Saini y Keum, 2018)	11
Figura 2.2 Ruta metabólica de síntesis de luteína (adaptado de Cezare-Gomes <i>et al.</i> , 2019).	15
Figura 2.3. Tipos de Fotobiorreactores	19
Materiales y Métodos	
Figura 4.1 Diseño general de la parte experimental	23
Figura 4.2 Imagen de fotobiorreactor de 5 L	24
Figura 4.3 Recubrimiento interior de la cámara de iluminación	28
Figura 4.4 Cámaras de iluminación	28
Figura 4.5 Fotobiorreactores utilizados	30
Figura 4.6 Dispositivo de aireación	31
Figura 4.7 Distribuidor de aire	31
Resultados y Discusión	
Figura 5.1 Valores de monitoreo de pH y conductividad eléctrica, en fotobiorreactor de 5 L	33
Figura 5.2 Crecimiento de biomasa en fotobiorreactores	34
Figura 5.3 Flóculo del consorcio BR-UANL-01	35
Figura 5.4 Micrografía de las microalgas detectadas	36
Figura 5.5 Micrografía del sobrenadante del reactor madre	36
Figura 5.6 Cambios en la coloración de la biomasa en los diferentes tratamientos del DOE	38
Figura 5.7 Datos correspondientes al monitoreo de pH en fotobiorreactores del DOE	39
Figura 5.8 Datos correspondientes al monitoreo de Conductividad eléctrica en fotobiorreactores del DOE	40
Figura 5.9 Incremento de biomasa y concentración de luteína en DOE	43
Figura 5.10 Cromatograma correspondiente al tratamiento de 5 watts, fotoperiodos de 24 h y luz fría	46
Figura 5.11 Comparación de espectros de absorción de pigmentos.	46
Figura 5.12 Valores de pH durante la fase de escalado e inducción de estrés	50
Figura 5.13 Valores de conductividad eléctrica durante la fase de escalado e inducción de estrés.	52
Figura 5.14 Porcentajes de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} , en cada etapa del escalamiento y en la fase de inducción de estrés.	55
Figura 5.15 Cinética de crecimiento del modelo logístico modificado	59
Figura 5.16 Acumulación de biomasa durante las etapas de escalamiento e inducción de estrés.	61

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1 Introducción

El consumo excesivo de pigmentos artificiales presenta un serio riesgo a la salud, esto debido a que su alto consumo puede causar reacciones como: dolor abdominal, náuseas, alergias, o problemas más graves como daño hepático, renal y diferentes tipos de cáncer (da Costa Cardoso, Kanno y Karp, 2017). Como consecuencia, diversos países han prohibido el uso de pigmentos artificiales, impulsando así el comercio y consumo de los productos llamados “orgánicos”. En industrias tanto de alimentos, bebidas y cosméticos, la inclinación del consumidor hacia los productos con ingredientes naturales ha aumentado, debido a que proporcionan beneficios para la salud al actuar como: agentes antioxidantes, moduladores del sistema inmune, preventivos contra diversos tipos de cáncer y protectores contra la radiación UV (Ambati *et al.*, 2018; Saini y Keum, 2018). De acuerdo con *ReportLinker* en 2020 y pese a la crisis por COVID-19, el mercado mundial de carotenoides ascendió a 1.7 MMDD, y se proyecta que para 2027 incremente a 2 MMDD. Por estas razones se han buscado nuevas opciones y desarrollado métodos alternativos para la obtención de pigmentos por vías no convencionales, como la síntesis microbiana usando microalgas (Ambati *et al.*, 2018).

De manera similar, durante la última década, los tratamientos de aguas basados en microalgas han llamado la atención, debido a que estos microorganismos son capaces de metabolizar compuestos de Nitrógeno (N) y Fosforo (P) de efluentes secundarios como aguas residuales, eliminando el riesgo de eutrofización en cuerpos receptores de descargas (Gonçalves, Pires y Simões, 2017). Esta metabolización de N y P la realizan aprovechando la energía solar y el CO₂ atmosférico, generando biomasa y una gran variedad de productos de alto valor comercial como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y precursores de vitaminas, como los carotenoides (Hoh, Watson y Kan, 2016; Kothari *et al.*, 2017; McGee *et al.*, 2020).

Los carotenoides en las microalgas son los pigmentos responsables de la colecta de fotones y la transferencia de energía a los centros de reacción, un proceso vital para la fotosíntesis, formando una estructura denominada complejo antena, la cual está localizada en la membrana tilacoide. Así mismo, son los encargados de proteger los centros de reacción contra el daño foto oxidativo (Pagels *et al.*, 2020; Alam *et al.*, 2021). Pero a pesar del interés en los pigmentos bioactivos, sus concentraciones (especialmente en condiciones óptimas de crecimiento), a menudo son bajas para que la producción de pigmentos con base en microalgas sea económicamente viable.

La producción de pigmentos en microalgas varía no sólo entre géneros y especies, sino también dependen de factores ambientales como: las condiciones de cultivo, la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes (N y P) en el medio o temperatura. En algunas microalgas verdes, las condiciones de estrés específicas como, la sobre saturación de fotones (luz), déficit de nutrientes o un incremento en las concentraciones salinas inducen a la sobreproducción de carotenoides secundarios como: β -caroteno, astaxantina o luteína; los cuales es sabido que juegan un papel importante como agentes antioxidantes, protegiendo así a la célula de radicales oxidantes (Skjånes *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2018; Gayathri *et al.*, 2020). En condiciones limitadas o exceso de luz, las microalgas pasan por un proceso de fotoaclimatación alterando la estructura de sus cloroplastos, el tamaño del complejo antena, la composición y la concentración de pigmentos para mantener la capacidad fotosintética (McGee *et al.*, 2020).

1.2 Justificación

Típicamente, en los países en vías de desarrollo, los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales (PTAR) son una fuente constante de nutrientes no aprovechados que contribuyen a la eutrofización de cuerpos de agua, además de presentar una composición fisicoquímica adecuada para el cultivo de microalgas. Un proceso terciario basado en microalgas presenta diversas ventajas como: 1) No requerir modificación del efluente, ni adición de reactivos o catalizadores químicos; 2) La generación potencial de productos de alto valor comercial (alimento para animales y humanos, biofertilizantes, ácidos grasos, pigmentos, bioactivos u otras especialidades); 3) Bajo uso energético y 4) generación

de un pulimento de alta calidad (reducción de N y P) en los efluentes secundarios municipales, sin generar contaminación secundaria.

En investigaciones previas (Beltrán-Rocha, 2014, Beltrán- Rocha, 2017 y Fariz- Salinas, 2019), en el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, reportaron un consorcio de microalgas autofloculantes nativas del Estado de Nuevo León, con una eficiente capacidad de remoción de nutrientes contaminantes, tales como nitrógeno (N) y fósforo (P), además de ser capaces de sintetizar luteína, un pigmento de interés comercial e industrial, registrando rendimientos similares a las cepas puras.

La presente investigación está enfocada en el desarrollo biotecnológico escalando un sistema de producción de luteína y tratamiento terciario de efluentes residuales municipales que cumplan la NOM-001-SEMARNAT-2021 utilizando microalgas con características floculantes nativas del 7 de Nuevo León. Mejorando así la calidad fisicoquímica de dichos efluentes (proceso de pulimento) a cuerpos de agua receptores, reduciendo las concentraciones de nutrientes contaminantes, con metas hacia la producción comercial del pigmento, aprovechando su capacidad para dotar de color, con un elevado rendimiento y económicamente rentable, contribuyendo así con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de la Organización de las Naciones Unidas, el proyecto de nación 2018-2024 en el cual son mencionados tópicos como el cuidado del agua, la sustentabilidad y el desarrollo regional así como la economía circular, y el consumo y producción responsable.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Colorantes y aditivos

El color es uno de los elementos de la naturaleza que ha tenido un impacto significativo en el desarrollo de culturas milenarias a lo largo de la historia de la humanidad. Plantas, animales y minerales han sido utilizados para la obtención de pigmentos y tintes desde la antigüedad, debido a que los colores están presentes en cada aspecto de nuestras vidas, desde la ropa que vestimos hasta los alimentos que consumimos. Algunas civilizaciones como la egipcia o la maya cambiaban el color de sus alimentos con raíces para hacerlos más apetecibles (McAvoy, 2014).

Por otro lado, los pintores usaban tintes naturales extraídos de plantas, insectos, moluscos y algunos minerales para sus obras. Las características únicas de dichas pinturas eran resultado de las diferentes mezclas entre los tintes, el mordiente y el barniz, responsables de la adherencia de los pigmentos, la protección de éstos al paso del tiempo y a los efectos del medio ambiente. En la actualidad algunos colorantes o aditivos de color son utilizados en textiles o en cosméticos (henna, catecú), medicamentos (azafrán, ruibarbo) y en alimentos (achiote, cúrcuma, cochinilla) (Yusuf, Shabbir, y Mohammad, 2017).

Los colorantes y aditivos de color, por definición, son todos aquellos tintes, pigmentos o sustancias, que, al aplicarse, pueden incrementar o dotar de color a diversos productos, sustancias u objetos (Altisent *et al.*2013). Así mismo, el color de un producto brinda al consumidor información sobre éste, ya sea del estado en que se encuentra, el sabor, la textura o inclusive el olor (Dikshit y Tallapragada, 2018).

En el caso de los alimentos, debido a que la percepción del color está directamente relacionada con el sistema sensorial humano y algunos hábitos de consumo, un producto con una coloración diferente, pobre o intensa podría ser aceptado o rechazado por el consumidor

inclusive aún sin probarlo. Hay que destacar que esto no es exclusivo de la industria de alimentos, sino también ocurre en la farmacéutica o la cosmética (Kumar, Venkatesh y Kumar, 2017).

En la industria alimentaria los pigmentos son usados con diversos propósitos, como: incrementar la aceptación, teñir, corregir las variaciones naturales de color, intensificar el color natural o simplemente cambiar la coloración de los alimentos con un fin en particular. Por otro lado, es común que en fármacos se utilice para hacer “aceptable” o atractivo un medicamento para los pacientes, o para crear uniformidad en el color de éste, inclusive, en ocasiones se utilizan ciertos colorantes o aditivos para crear opacidad, la cual genera protección y estabilidad a los principios activos que pueden ser fotosensibles (Kumar, Venkatesh y Kumar, 2017). En la industria cosmética los colorantes y los aditivos de color son usados en maquillajes, productos del cuidado de la piel (skin care), higiene personal, cuidado del cabello, fragancias y cuidado bucal (Dikshit y Tallapragada, 2018).

2.1.1 Clasificación de los colorantes y los aditivos

Los pigmentos pueden clasificarse de varias maneras, como por ejemplo: dependiendo de la industria en la que sean utilizados; su carga eléctrica y su origen. Siendo esta última clasificación, la utilizada en esta investigación, identificándolos de forma global como pigmentos de origen natural y pigmentos de origen sintéticos.

Los pigmentos naturales son aquellos que pueden ser obtenidos a partir de recursos biológicos tales como plantas, insectos y microorganismos. Algunos pigmentos obtenidos de manera natural son: melanina, violaceína, quininas, flavinas, monascinas, ficocianina y carotenoides sólo por mencionar algunos (Dufossé, 2006).

Por otro lado, los pigmentos sintéticos son aquellos que fueron generados artificialmente y no son encontrados en la naturaleza. Algunos ejemplos son: los de base de hidrocarburos aromáticos (antraceno, benceno, naftaleno, carbazol, tolueno y xileno), junto con grupos químicos tales como: nitro, amino y ácido sulfúrico (Amold *et al.*, 2012). Generalmente estos tintes o pigmentos son añadidos a los productos para compensar la pérdida natural del color durante el proceso de almacenamiento y proveer la apariencia deseada por más tiempo (Amold *et al.*, 2012). Los pigmentos sintéticos son clasificados en (la E seguida de la

numeración, es la clasificación que se le da en la Unión Europea, según los códigos alimentarios):

- Compuestos Azo:
 - Tartrazina E-102
 - Amarillo crepúsculo E-110
 - Azorrubina E-122
 - Amaranto E-123
 - Ponceau 4R E-124
 - Rojo Allura AC E-129
 - Marrón HT E-155
 - Negro brillante BN E-151
- Pigmentos que contiene el grupo Trifenilmetano
 - Azul brillante FCF E-102
 - Azul patentado V E-131
 - Verde rápido CFC E-143
- Quinofalona ©
 - Amarillo de Quinoleína E-104
- Xantenos
 - Eritrosina E-127
- Pigmentos Índigo
 - Carmín de Índigo (Indigotina) E-132

Algunas de las ventajas que presentan los pigmentos sintéticos contra los naturales es que cuentan con una mayor estabilidad, pueden generar tonos que los pigmentos naturales no, son más económicos y no dependen de problemas externos para su generación o extracción, sin embargo, estudios recientes sugieren que este tipo de pigmentos puede afectar la salud humana (Vojdani y Vojdani, 2015).

2.1.2 Toxicidad de los pigmentos sintéticos

Debido al riesgo potencial a la salud humana que presentan algunos pigmentos sintéticos, diversos países han adoptado regulaciones para disminuir su uso (da Costa Cardoso, Kanno y Karp, 2017). Algunas de las consecuencias de su consumo desmedido son: dolor abdominal, náuseas, alergias, e incluso algunos padecimientos del sistema inmune o casos

más graves daño hepático y renal, así como diferentes tipos de cáncer (Vojdani y Vojdani, 2015; Mota *et al.*, 2021).

Los colorantes o aditivos de color son partículas pequeñas, que en ocasiones causan problemas en el sistema inmune debido a que no son reconocidas por éste. Por lo que, si estas moléculas se unen a las proteínas de los productos o del cuerpo humano, después de la metabolización no son detectados por el sistema inmune, si esto no ocurre, estas moléculas son percibidas como agentes extraños por el sistema inmune, desencadenando las reacciones alérgicas (Jones y Burks, 2008).

La adición de colorantes artificiales a los alimentos, medicamentos o productos de cuidado personal puede generar este tipo de respuestas inmunes. Se cree que la tartrazina es un detonante para los ataques de asma y urticaria, particularmente en pacientes que son intolerantes a las aspirinas (Rajagopal, Sreejith y Premaletha, 2016). Esta reacción ocurre después de consumir algún producto que contenga este colorante. Por otro lado, los niños con eccema severa pueden tener reacciones ante este pigmento (Van Bever, Docx y Stevens, 1989; Amin, Hameid II y Abd Elsttar, 2010). Numerosos estudios y casos reportados asocian el uso de pigmentos como: la tartrazina, rojo allura AC y eritrosina con las reacciones alérgicas, anormalidades inmunológicas como urticaria crónica angioedema y rinitis (Vojdani y Vojdani, 2015). En investigaciones como las realizadas por Stevens *et al.* 2011, Nigg *et al.*, 2012 y Vojdany y Vojdani, 2015, se sugiere que la ingesta de alimentos con colorantes artificiales puede promover problemas en niños con trastorno de déficit de atención; esto debido a que se incrementan la dificultad para mantener la atención, la hiperactividad y el comportamiento impulsivo. Tanto en la investigación de Stevens *et al.* 2011, como la de Nigg *et al.*, 2012 y la de Vojdany y Vojdani, 2015, las dietas de los sujetos de estudio fueron modificadas y se observó un cambio en el comportamiento, mejorando la atención y disminuyendo el comportamiento impulsivo.

Por otro lado, los compuestos azo (pigmentos de colores brillantes), presentan potencial cancerígeno, debido a que después de la azoreducción se generan metabolitos cancerígenos. Aunque naturalmente estos compuestos son generados por el cuerpo humano, la importancia radica en las cantidades ingeridas de estos colorantes (Amchova, Kotolova, y Ruda-Kucerova, 2015). Debido a lo anterior, es importante reconocer qué productos contienen

estos colorantes y reducir su consumo, para disminuir la probabilidad de generar alguna de las consecuencias a la salud antes mencionadas.

Aunado a lo anterior, los pigmentos sintéticos también generan un grave problema al medio ambiente, ya que al ser vertidos en cuerpos de agua, estos impiden el paso de la luz solar a través del agua, imposibilitando la realización de la fotosíntesis, inhibiendo a su vez el crecimiento de organismos fotosintéticos, también, incrementan la demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO y DBO, respectivamente), estos pigmentos son recalcitrantes, se bioacumulan en los organismos y son potencialmente cancerígenos (Sarayu y Sandhaya, 2012; Aghaie-Khouzani *et al.*, 2012; Ardila-Leal *et al.*, 2021) . En general, este tipo de pigmentos no son biodegradables, debido principalmente a sus propiedades químicas y estructuras, que los mantienen estables y perdurables por largos periodos de tiempo (aproximadamente 50 años o incluso más) (Ardila-Leal *et al.*, 2021). Es justo por estas razones, que la demanda de pigmentos de origen natural va en ascenso, ya que éstos son vistos como eco amigables, son biodegradables, asimilables por los organismos, además de presentar una gran versatilidad de usos en diversas industrias, derivados de su grado de pureza, así como, su producción en muchas ocasiones requiere menos consumo energético que sus contrapartes sintéticas (Mridha *et al.*, 2021).

2.2 Regulaciones para el uso de pigmentos sintéticos

A causa de los posibles riesgos que los colorantes sintéticos pueden generar en la salud, es necesario regular su uso. En muchos países éste es controlado y regulado, tomando en cuenta cuestiones como: las sustancias utilizadas, la fuente, la pureza y cuáles productos se utilizan, y en algunos otros la regulación está basada en los usos tradicionales o locales del pigmento. En el mundo existen entidades reguladoras de los aditivos para alimentos, medicamentos y cosméticos. En la Unión Europea (UE) está la European Food Safety (EFSA) y en Estados Unidos la Food and Drug Administration (FDA) (Carocho *et al.*, 2014), en México contamos con la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y a nivel mundial se encuentran la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés). Todas estas entidades concuerdan con asignar un valor de ingesta diaria aceptable a un aditivo, de acuerdo con su evaluación toxicológica. Este valor, expresado en

mg / kg de peso corporal por día, lo cual constituye la base para la inclusión o exclusión de aditivos de la lista de los aditivos alimentarios denominados “seguros para el consumo” (Dirkshit y Tallapragada, 2018).

Sin embargo, las regulaciones para los aditivos de color no son nada nuevo. En la UE, de acuerdo con la primera directiva relacionada con los aditivos en alimentos, publicada en 1962, 36 colorantes fueron permitidos, de los cuales 20 eran colorantes naturales y los 16 restantes tintes sintéticos; sin embargo, estas leyes resultaron contradictorias para algunos países miembros de la UE, lo cual generó un problema para el comercio entre algunas naciones; por ejemplo, Alemania permitía el uso de quinolina amarilla pero prohibía el uso de tartrazina, mientras en Francia la situación era opuesta. Este tipo de contradicciones en el uso de pigmentos afectó directamente las exportaciones e importaciones (Dirkshit y Tallapragada, 2018). Para estandarizar y regular varios de los pigmentos utilizados durante el proceso de alimentos, otra directiva entró en vigor en 1989 la (89/107/EEC). En ésta brindaba una clara definición de colorante para alimentos, la cual era “*se define como colorante alimentario a toda sustancia no consumida como un alimento en sí, pero añadida con un propósito específico, pudiendo tener o no valor nutritivo*”, por lo tanto, esto no era aplicable a los coadyuvantes tecnológicos, nutrientes y aromatizantes. En la actualidad, la directiva que regula el uso de los colorantes y pigmentos en alimentos es la (94/36/EC), en ella la definición de colorante alimenticio cambió a: “*sustancia que añade, mantiene o reinstaura el color en productos alimenticios pero que no son consumidos como alimentos por sí solos*”. Actualmente esta directiva que sustituyó a la promulgada en 1962 permite el uso de 43 colorantes como aditivos alimenticios, de los cuales 17 son sintéticos (Dirkshit y Tallapragada, 2018).

Por otra parte, en Estados Unidos, debido al abuso de los colorantes sintéticos por parte de industrias alimentarias, a inicios del siglo XX se publicó una lista de colorantes permitidos en alimentos (Burrows, 2009). En los 60’s la enmienda de los aditivos de color incorporó la cláusula Delaney, en la cual se prohibían colorantes que generaban cáncer en humanos o animales. Actualmente esta cláusula ha sido modificada y dictamina que ningún aditivo puede ser aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), si se demuestra que causa cáncer en humanos o en animales (McAvoy, 2014; Lehto *et al.*, 2017).

En la actualidad son dos las categorías principales que componen la lista de aditivos de color permitidos por la FDA:

Aditivos de color certificados: son moléculas orgánicas producidas sintéticamente, usadas ampliamente para impartir color uniforme e incrementar la intensidad de este. Son menos costosos y se mezclan fácilmente produciendo una variedad de tonos (McAvoy, 2014; Stich, 2016).

Aditivos de color exentos de certificación: en esta categoría se incluyen a los pigmentos de origen natural, obtenidos de vegetales, minerales o animales y sus réplicas sintéticas. Estos aditivos de color suelen ser más costosos que los aditivos de color certificados. Si bien, no están sujetos a la certificación de lotes, siguen siendo aditivos de color artificial y deben cumplir los requisitos de composición y pureza enumerados en el Código de Regulaciones Federales (CFR) (McAvoy, 2014; Stich, 2016). Cabe hacer mención que, para la FDA, ningún aditivo de color es considerado ingrediente “natural” en los alimentos, debido al hecho de que agregarlos artificialmente es contradictorio con un estado natural (Stich, 2016).

En México, la entidad encargada de regular el uso de los aditivos de color es COFEPRIS, en su reglamento en el anexo III hace referencia a sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias, los cuales se pueden utilizar de manera inmediata, toda vez que hayan sido evaluados y aprobados por la Secretaría. En octubre de 2020, en su portal de internet, la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO), dedico un artículo referente a los aditivos de color: “*Informa PROFECO sobre colorantes artificiales en los alimentos*”. En él se hace énfasis sobre los riesgos de salud como consecuencia del consumo de alimentos con colorantes artificiales y se menciona una lista de colorantes artificiales, en qué tipo de alimento puede ser encontrado y otros nombres con los que son conocidos. De igual forma existen Normas Oficiales Mexicanas (NOM) en las cuales se establecen los colorantes permitidos en diferentes tipos de productos como la NOM-118-SSA1-1994, en donde se establecen las materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza, colorantes y pigmentos inorgánicos y especificaciones sanitarias. De igual forma, en diciembre de 2020, se propuso una iniciativa con proyecto de decreto para reformar los artículos 194, 215 FRACCIONES I, II, III, IV, V, VI Y VII, 282 BIS, ADICIÓN DEL 282 TER, 283 Y 284 DE

LA LEY GENERAL DE SALUD, en el documento, entre otros aspectos, es señalada la importancia de regular adecuadamente los pigmentos sintéticos y los aditivos de color en alimentos, bebidas, fármacos y productos de belleza, de acuerdo con el panorama internacional, debido a que en México aún se utilizan ciertos colorantes que en el resto del mundo son considerados como dañinos para la salud, por lo que es necesario hacer reestructuraciones en las normativas e incentivar a los fabricantes a introducir pigmentos de origen natural, como los carotenos (β -caroteno y licopeno) y las xantofilas (astaxantina, zeaxantina, luteína) en sus formulaciones, para proteger la salud de la población.

2.3 Luteína

Los carotenoides son un gran grupo de cromóforos biológicos los cuales absorben luz en un intervalo entre 400 y 550 nm. Dentro de este extenso grupo, la luteína pertenece a las xantofilas, las cuales se caracterizan por contar con hidrocarburos oxigenados, éstos presentan una estructura con dos ciclohexenos unidos por 18 carbonos conjugados con dobles enlaces **Figura 2.1**, siendo de color amarillo. Por lo general este pigmento es obtenido de organismos fotosintéticos tales como plantas, algas y microalgas, ya que está presente en sus fotosistemas, (D'Este, De Francisci y Angelidaki, 2017; Low, Idris y Yusof, 2020), donde este pigmento cumple varias funciones muy importantes como:

- I. Estabilización estructural de proteínas del complejo antena.
- II. Captura de luz (transferencia de energía de excitación a la clorofila).
- III. Disipar el calor de las moléculas de clorofila excitadas.

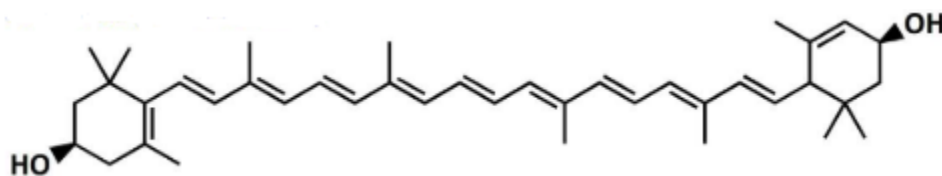


Figura 2.1. Estructura de la luteína (Saini y Keum, 2018).

La luteína es un compuesto liposoluble capaz de captar radicales libres y Oxígeno singlete, actuando como un antioxidante natural en las células. Este pigmento no es sintetizado por el cuerpo humano; sin embargo, puede estar presente en la piel debido a los alimentos que se ingieren, actuando como un filtro que la protege de la luz UV y la luz azul, además de ser un agente antioxidante beneficiando al sistema inmune (Žmitek *et al.*, 2020), también es una de

las xantofilas más predominantes presentes en la región de la mácula ocular ubicada en la retina, en dónde protege los fotorreceptores en la retina contra los efectos nocivos de la luz azul y mejora de la agudeza visual. Existe evidencia científica que indica que la luteína reduce el riesgo de cataratas, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad. Este pigmento también posee actividad antioxidante, de igual forma, presenta características nutraceuticas como la prevención de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, ceguera relacionada a la edad y diversos tipos de cáncer (Gong, Wang y Bassi, 2017; Chen *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019; Low *et al.*, 2020; Žmitek *et al.*, 2020).

La luteína también es un aditivo de color utilizado tanto en la industria cosmética como en la industria de alimentos. Esto es debido a su característica antioxidante y a la capacidad de brindar color amarillo, naranja o rojo a productos que así lo requieran, como por ejemplo, en la industria avícola es utilizada para colorear la piel de los pollos y de las yemas de huevo (Arathi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019)

2.3.1 Mercado de luteína a nivel global

Como se mencionó anteriormente, en las industrias tanto de alimentos, bebidas y cosméticos la preferencia de los consumidores por productos con ingredientes naturales en vez de sintéticos ha aumentado considerablemente, debido a los beneficios a la salud que éstos ofrecen (Saini y Keum, 2018). De acuerdo con ReportLinker en 2020 y pese a la crisis por COVID-19, el mercado global de luteína se estimó en 289.6 MDD, y se espera que para 2027 ascienda a 411.6 MDD. Con miras a cumplir las necesidades del mercado actual y la necesidad de reducir el impacto negativo al medio ambiente, se han investigado métodos de síntesis en los que se generen altos rendimientos, en respuesta, el interés en microorganismos como las microalgas ha crecido, debido a que éstos proveen una solución económica a la generación de bioproductos de valor agregado como lo es la luteína (Ambati *et al.*, 2018; Mahapatra *et al.*, 2018; Sosa-Hernández *et al.*, 2019).

2.4 Microalgas

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos adaptados para vivir en sistemas acuáticos, suelo o como simbioses, y únicamente necesitan luz, agua, CO₂ y nutrientes inorgánicos para su crecimiento. Éstas pueden tener un régimen metabólico autótrofo o

fotoautótrofo, donde la microalga utiliza sólo la luz como fuente de energía, generando moléculas para el mantenimiento de la célula a través de las reacciones dependientes de la luz en la fotosíntesis, heterótrofo al asimilar el carbón y energía de fuentes o compuestos orgánicos, eliminando por completo la dependencia de la luz en su metabolismo, o desarrollar un metabolismo mixótrofo en el que la fotosíntesis es la principal fuente de energía; sin embargo, la célula también puede asimilar el carbón de compuestos orgánicos (Mahapatra, 2017 ;Sun *et al.*, 2018; Levasseur, Perré y Pozzobon, 2020). Estos microorganismos contribuyen activamente a procesos ambientales como la generación de oxígeno, la asimilación de metales pesados y nutrientes como nitrógeno (N) y fósforo (P) inorgánico en aguas, pueden servir como fertilizante en tierra agrícola sin comprometer la producción de alimentos u otros productos resultado de estos cultivos y fijar el CO₂ atmosférico (Proabhakara, 2015; Beltrán-Rocha, 2017; Mahapatra, 2017).

En consecuencia, el aprovechamiento de las microalgas para la remediación es un proceso con muchas áreas de oportunidad, principalmente por el beneficio ambiental que esto conlleva, a su vez, la generación de biomasa que puede ser procesada para la obtención de productos de alto valor (PAV).

2.4.1 Tratamiento de aguas con microalgas

La aplicación de microalgas en el procesos de tratamiento o pulimiento de aguas de desecho es conocido como ficoremediación y ha sido estudiado por más de 60 años. Algunas de las ventajas sobre el proceso de tratamiento de aguas convencional incluye los altos niveles de recuperación de nutrientes, el bajo consumo de energía y la cero emisión de huella de Carbono, además de no utilizar agentes químicos para la formación de lodos, en conjunto con la generación de biomasa y síntesis de PAV aseguran una producción y un tratamiento, ambientalmente responsable y sostenible, al no generar externalidades ambientales (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017a; Mahapatra, 2017; Hu *et al.* 2018; Cavieres *et al.*, 2021).

Sin embargo, antes de aplicar este tipo de tecnología a escala industrial, es pertinente conocer algunos aspectos, como identificar la capacidad de remoción de contaminantes de las especies, la composición de la biomasa, conocer los parámetros críticos del proceso como factores abióticos: intensidad lumínica, temperatura, pH, además de algunos parámetros operativos como: agitación, aireación o captura de CO₂ para una óptima remoción de

contaminantes y crecimiento de biomasa (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017a). En este tipo de tratamientos las microalgas actúan como catalizadores que fijan los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Además de los grandes beneficios al medio ambiente, la biomasa juega un papel importante ya que se ha convertido en una materia prima prometedora, por la gran cantidad de PAV que pueden ser obtenidos a partir de ella, tras la metabolización de los contaminantes (Hamed, 2016; Sun *et al.*, 2018; Sosa-Hernández *et al.*, 2019).

2.4.2 Síntesis de Productos de Alto Valor (PAV)

Las células de microalgas contienen una vasta cantidad de compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios, los cuales son biosintetizados a través de diferentes rutas metabólicas, tanto su producción como su acumulación es afectada por diversos factores bióticos y abióticos del medio (Andrade *et al.*, 2021). Desde hace algunos años, el cultivo de microalgas, la cosecha y extracción de productos se ha incrementado, ya que se pueden extraer compuestos como: proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y pigmentos naturales, como la luteína, aunado a sus múltiples usos comerciales como: suplementos de alimentos saludables (nutraceúticos), fármacos, antivirales, antimicrobianos, antiinflamatorios, antioxidantes, precursores de vitamina A, inmunomoduladores y anticancerígenos. También algunas especies de microalgas son consideradas como productos generalmente reconocidos como seguros (Generally Recognized as Safe GRAS), de acuerdo con la FDA (Cezare-Gomes, *et al.*, 2019; Abu-Ghosh *et al.*, 2021).

2.4.2.1 Síntesis de Luteína

Naturalmente, este pigmento se sintetiza por la vía de la carotenogénesis que comienza en el cloroplasto, con el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), a través de la enzima fitoeno sintetasa (PSY), la cual da origen a la hidrocarburo fitoeno. La enzima PSY es la enzima clave para la biosíntesis de carotenoides. La ruta metabólica que siguen los organismos que sintetizan estos pigmentos se muestra en la **Figura 2.2**, siguiendo la secuencia: fitoeno (incoloro), fitoflueno (incoloro), ζ -caroteno (color verde), neurosporeno (color naranja/amarillo), licopeno (color rojo), δ -caroteno (color naranja), α -caroteno (color naranja) y luteína (color amarillo) (Cezare-Gomes *et al.*, 2019).

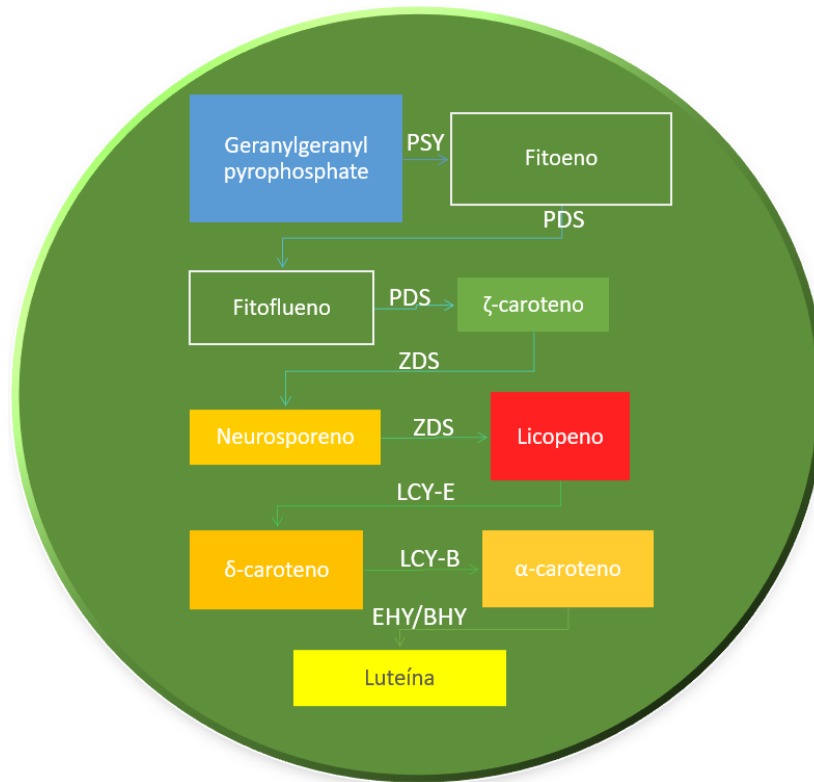


Figura 2.2 Ruta metabólica de síntesis de luteína (adaptado de Cezare-Gomes *et al.*, 2019). (PSY), fitoeno desaturasa, (PDS), ζ-caroteno desaturasa, licopeno β-ciclasa (LCY-B), β-caroteno hidrolasa (BHY), licopeno ε-ciclasa (LCY-E), ε-caroteno hidroxilasa (EHY), y β-caroteno cetolasa (BKT)

La presencia de pigmentos intracelulares en las células de microalgas es pequeña, ya que va desde el 0.1 al 0.2% del peso seco, pudiendo llegar hasta un 14% en algunas especies. Es por esta razón que se requieren métodos para que las células induzcan la síntesis y aumentar su concentración. Los tipos de estrés que inducen a la acumulación de estos pigmentos incluyen un incremento en la temperatura del medio de crecimiento, un aumento o disminución de la intensidad lumínica (flujo de fotones), salinidad, cambios en la concentración de nutrientes, así como inhibidores del proceso metabólico (Kurmen, González y Klotz, 2013; Markou y Nerantzis, 2013).

Dentro de algunos de los parámetros fisicoquímicos que influyen en la síntesis de luteína, se encuentran la intensidad de luz, el dióxido de carbono (CO₂) y componentes del medio como: nitrato, manganeso y cobre, estos son conocidos como factores primarios de influencia crítica de crecimiento y acumulación de luteína. La biosíntesis de este pigmento puede aumentar con una óptima intensidad de iluminación, debido a que la luteína está presente en el complejo fotosintético conocido como antena. No confundir el termino óptimo con alta

iluminación debido a que algunas cepas como *Chlorella zofingiensis* acumula luteína con alta intensidad de iluminación, por el contrario, cepas como *Coccomyxa onubensis* y *Muriellopsis* sp. tienden a acumular luteína en intensidades de iluminación de baja a media (Xie *et al.*, 2013; Vaquero *et al.* 2014). De cualquier modo, existe poca información sobre los efectos de la intensidad lumínica y la producción de luteína en microalgas (Gayathri *et al.*, 2020).

2.4.3 Consorcio de Microalgas BR-UANL-01

El consorcio de microalgas BR-UANL-01, es un conjunto de especies de microalgas y cianobacterias que incluyen géneros como: *Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Leptolyngbya* sp. y *Aphanocapsa* sp, esta mezcla de especies le da al consorcio diversas características que pueden ser aprovechadas tanto a nivel ambiental como a nivel económico y de producción. Este consorcio es capaz de generar hasta 4.4 g/L de biomasa y asimilar nutrientes de las aguas de desecho que pueden favorecer fenómenos como la eutrofización en cuerpos de agua receptores, el cual reduce la calidad de ésta y desequilibra los ecosistemas (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017b), disminuyendo el fosforo hasta un 99% y el nitrato en una proporción mayor a 80% (Beltrán-Rocha, 2014), sintetizando a la par PAV como la luteína en hasta 2.93 mg/g de peso seco (Fariz-Salinas, 2019), aunado a las características antes mencionadas también presenta capacidad floculante (Beltrán-Rocha, 2017), es decir que la biomasa puede sedimentar sin la necesidad de adicionar agentes químicos, convirtiendo la generación de biomasa como la acumulación de luteína en un proceso amigable con el medio ambiente.

2.4.3.1 Floculación y su importancia

Uno de los retos más importantes que se presentan en el cultivo de microalgas a nivel industrial, independientemente del producto final, es la separación del medio de cultivo de la biomasa. A este proceso se le conoce como “cosecha de biomasa” (Schlesinger *et al.*, 2012). Los métodos de cosecha utilizados comúnmente son: centrifugación, floculación química, electrofloculación, filtración o sedimentación, lo cual es un reto cuando se tienen grandes volúmenes de operación, debido al tamaño de partícula (2-20 µm de diámetro), la baja

densidad (0.5-5.0 g/L de peso seco) o a la gran estabilidad coloidal de las microalgas (Beltrán-Rocha *et al.*, 2021).

El no contar con una tecnología eficiente de recuperación de biomasa puede incrementar el costo de la producción entre un 20 a un 30% del costo total de producción (Wan *et al.*, 2015). La autofloculación ha llamado la atención recientemente como un método de cosecha de microalgas de bajo costo.

Este proceso consiste en que la superficie de las células cargadas negativamente es neutralizada con sales precipitadas cargadas positivamente (Ca^{2+} , P^+ y/o Mg^{2+}) en un pH alcalino >8 . Una de las mayores ventajas de este proceso es el incremento natural del pH como resultado de la actividad fotosintética y la acumulación de OH^- , este comportamiento puede evitar la lisis celular y la pérdida de contenido intracelular (Beltrán-Rocha *et al.*, 2021). De igual manera la autofloculación y el aumento del pH también pueden aumentar por condiciones de cultivo como la baja capacidad buffer del sistema de carbonato, el cual está relacionado con la fuente de carbono (C) y al uso de NO_3^- como fuente de N, puesto que 1 mol de NO_3^- asimilado genera de forma equivalente 1 mol de OH^- (Nguyen *et al.*, 2014). Por consiguiente, utilizar un consorcio capaz de realizar autofloculación disminuiría los problemas generados en la cosecha de biomasa, así como reduciría gastos de producción y operación a nivel industrial.

2.5 Fotobiorreactores

A escala industrial, el cultivo de microalgas puede realizarse en dos tipos de sistemas, sistemas abiertos (lagos y estanques), estos requieren grandes extensiones de tierra, se pueden llegar a presentar problemas de contaminación del medio, el mezclado del medio es complicado, la acumulación de biomasa de microalgas es reducida, la cosecha es difícil y una vez diseñado este sistema es muy complicado llevar a cabo una optimización del proceso, sin embargo la inversión es menor que en los sistemas cerrados. Por otro lado, los sistemas cerrados (fotobiorreactores), requieren un área reducida para su construcción, se reducen los problemas de contaminación del medio por agentes externos, el mezclado del medio es sencillo, se pueden obtener mayores rendimientos en la acumulación de biomasa de microalgas, la cosecha de la biomasa es simple además de que se puede optimizar el sistema una vez puesto en operación (Beltrán-Rocha, 2017).

La utilización de un sistema u otro va encaminada al objetivo final de la biomasa o del metabolito que se pretende sintetizar. En el caso de los fotobiorreactores, se recomienda utilizar uno en el que se pueda cultivar cualquier tipo de cepa, que presente uniformidad en la iluminación, así como una fácil transferencia de masa entre el CO₂ y el O₂, así como que el fotobiorreactor debe tener pocas o nulas partes no iluminadas (Tsoglin *et al.*, 1996). Algunos de los fotobiorreactores más utilizados para la generación de biomasa de microalgas son:

- Fotobiorreactor tubular horizontal (**Figura 2.3A**): como su nombre lo indica, éstos son dispuestos de forma horizontal, dando el diseño de un conjunto de tubos en paralelo, en forma de bucle, lo cual les proporciona una ventaja en el cultivo al aire libre, debido a que pueden ser orientados al sol, generando una alta eficiencia de conversión de luz. La mezcla de CO₂ se introduce por una conexión al tubo para permitir el intercambio de gases, sin embargo, se podrían generar acumulaciones de oxígeno no deseadas generando el efecto Warburg. (Mirón *et al.*, 1999; Kutschera *et al.*, 2020).
- Fotobiorreactor de tanque agitado (**Figura 2.3B**): este tipo de fotobiorreactor es uno de los más utilizados en la producción industrial. Consiste en la agitación mecánica con ayuda de un impulsor de diferentes tamaños o formas (los cuales responden a las necesidades de la producción), se utilizan deflectores para reducir el vórtice, se le suministra con una mezcla de aire y CO₂ además es iluminado externamente con lámparas fluorescentes, sin embargo una de las desventajas de este fotobiorreactor frente a otros sistemas es que la relación entre el área y el volumen puede disminuir la eficiencia de la captura de fotones (Singh y Sharma, 2012)
- Fotobiorreactor vertical tubular (**Figura 2.3C**): consta de un tubo vertical transparente, el cual permite el paso natural de la luz. La fuente de aireación es colocada en la parte inferior del reactor que convierte el gas entrante en pequeñas burbujas. Éstas proporcionan un mezclado homogéneo, además de brindar transferencia del CO₂ y elimina el O₂ producido durante la fotosíntesis. A su vez este tipo de fotobiorreactores puede dividirse dependiendo el flujo del líquido en columna de burbujeo y airlift, además los reactores de columna de burbujeo proveen una mayor

transferencia de oxígeno por unidad de energía suministrada (Shuler, Kargi y DeLisa, 2001; Singh y Sharma, 2012).

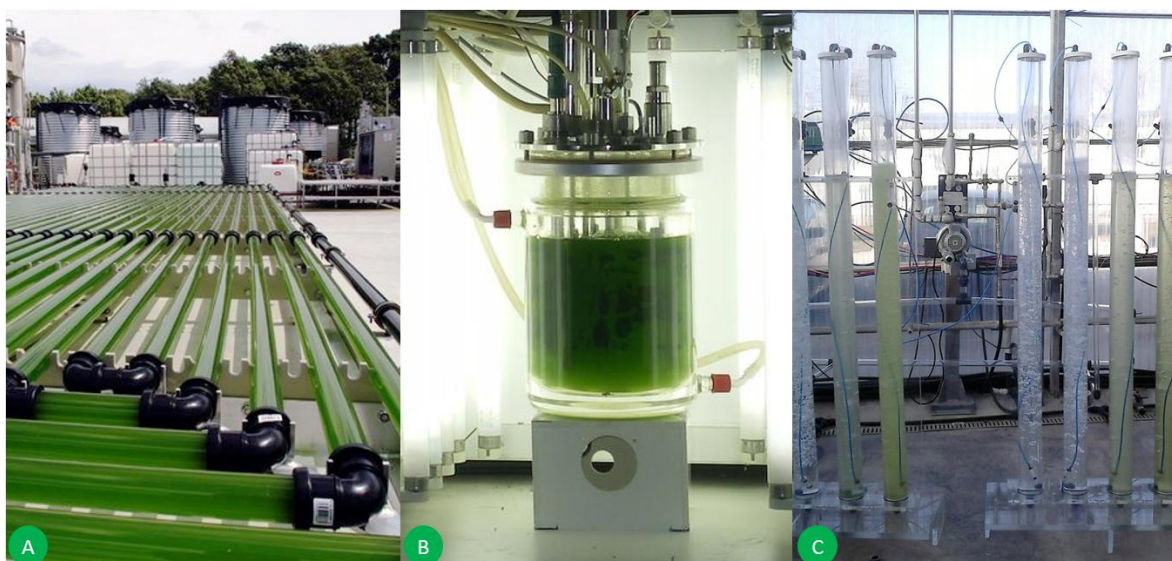


Figura 2.3. Tipos de fotobiorreactores A) fotobiorreactor horizontal tubular (Young-Lorenz, 2013), B) fotobiorreactor de tanque agitado (Mundoagro, 2023) C) fotobiorreactor vertical tubular (Biotech & Sostenibility, 2023).

2.6 Escalamiento

Actualmente, en la industria de bioprocesos se requieren rutas eficientes y sostenibles para la manufactura de bioproductos. Sin embargo, la brecha existente entre el ambiente celular a escala laboratorio, dónde se desarrollan y surgen los procesos biológicos aplicados a la generación de PAV y la escala industrial es extensa, por lo que un escalamiento exitoso en la mayoría de los casos es sumamente tardado, generando una problemática para pasar de la innovación hasta la producción y comercialización (Delvigne y Noorman, 2017).

Tomando en consideración la versatilidad de las microalgas para sintetizar PAV utilizando medios de cultivo como las aguas residuales tratadas, así como, características propias de las cepas como la autofloculación, es importante conocer las condiciones de operación óptimas en las que se pueden obtener cantidades significativas de productos de interés como la luteína, una vez detectadas y conociendo el proceso de biosíntesis, es entonces cuando se puede optar por aumentar el volumen del cultivo, escalando el proceso, identificando claramente los factores limitantes (Ruiz *et al.*, 2019).

De igual forma, es importante la selección de las condiciones de diseño y de procedimientos operacionales, con el objetivo de asegurar que los efectos de las variables del proceso sea el mismo en diferentes tamaños. Dentro de algunos de los parámetros de escalado comúnmente utilizados se encuentran propiedades como la hidrodinámica y transferencias de masa en el escalamiento de biorreactores; también, algunas de las principales variables se mantienen constantes, como la potencia de agitación por volumen de reactor, el coeficiente de transferencia de masa volumétrica, o el tiempo de mezclado (Najafpour, 2015). Al hablar de bioprocesos algunos de los problemas que surgen son: mantener la homogeneidad en los sistemas de escala mayor, cambios en la relación volumen-superficie o cambios en el medio de cultivo por el incremento del tiempo de cultivo (Shuler, Kargi y DeLisa, 2001).

Debido a que el escalamiento basado en cálculos fundamentales es una labor intensiva y requiere de gran experiencia, en la actualidad existen métodos más simples que regularmente son empleados. Éstos son conocidos como semi-fundamentales, los cuales incluyen cálculos de ecuaciones fundamentales simplificadas dependiendo de la escala. El escalamiento realizado por análisis dimensionales requiere de mantener grupos adimensionales constantes como la velocidad de bombeo o el número de Reynolds. Sin embargo, mantener todos los grupos adimensionales constantes no es posible y se tienen que tomar decisiones para definir los grupos más importantes. Regularmente, para el escalamiento se utilizan reglas fundamentales (Nauha *et al.* 2015; Vanags, *et al.*, 2015). Que van desde el mantener la velocidad de aireación específica (VVM) constante y el consumo de potencia volumétrica o el escalamiento a través de un coeficiente volumétrico de transferencia de masa constante solo por mencionar algunas técnicas (Delvigne y Noorman, 2017).

Por lo tanto, identificar los factores limitantes del escalado de producción de biomasa es crucial para incrementar la acumulación de ésta. Por lo que es una prioridad determinar la viabilidad y factibilidad del proceso en una escala menor, previo a la producción en escalas mayores. Idealmente, la evaluación de los criterios de escalado debe ser llevada a cabo con el fin de proveer la misma producción tanto a pequeña como a gran escala (Deniz, 2020).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Es posible incrementar la producción de luteína en el consorcio de microalgas floculantes BR-UANL-01 modificando parámetros de iluminación y simultáneamente remover NO_3^- y PO_4^{3-} de un efluente secundario utilizado como medio de cultivo previo al escalado a nivel semipiloto.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general.

Incrementar la producción de luteína en el consorcio de microalgas BR-UANL-01 y remover NO_3^- y PO_4^{3-} de un efluente eutrófico en un fotobiorreactor a escala laboratorio y a escala semipiloto.

3.2.2 Objetivos específicos.

- I. Reactivar el consorcio de microalgas autofloculantes BR-UANL-01.
- II. Identificar las condiciones óptimas de intensidad, fotoperiodos y color de luz que promuevan la producción de luteína en el consorcio BR-UANL-01 a través de un diseño factorial completo 2^3
- III. Determinar la luteína, la biomasa producida y la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del medio de cultivo, tras el diseño de experimentos por parte del consorcio de microalgas floculantes BR-UANL-01.
- IV. Ensamblar un fotobiorreactor de tipo columna de burbujeo en escala semipiloto con un volumen total de 100 L.
- V. Escalar fotobiorreactores con condiciones óptimas de iluminación identificadas previamente en el diseño factorial completo 2^3 .

- VI. Determinar la producción de luteína, biomasa producida y la eliminación de NO_3^- y PO_4^{3-} tras el escalado.

3.3 Aportación científica

El desarrollo de este proyecto de investigación fue resultado del seguimiento a trabajos previos realizados en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la FCQ, UANL, dónde fueron utilizados consorcios de microalgas nativos del Estado de Nuevo León, para la remoción de nutrientes contaminantes en efluentes secundarios responsables de la eutrofización en cuerpos de agua receptores, el consorcio seleccionado tiene capacidad floculante y de síntesis de luteína naturalmente, por lo que esta investigación propone un proceso de obtención de luteína, para ser utilizado primeramente como pigmento, siguiendo los lineamientos de la economía circular con miras a la producción sustentable de luteína a gran escala.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de Trabajo.

Para realizar los trabajos e investigación de este proyecto, se contó con la infraestructura del laboratorio de Físicoquímica del Departamento de Ingeniería Ambiental, de la Facultad de Ingeniería Civil de la UANL.

4.2 Plan de Trabajo del Proyecto de Investigación

En la **Figura 4.1** se muestra el planteamiento del proyecto de investigación en un diagrama de flujo como síntesis de las diferentes etapas y su interrelación.

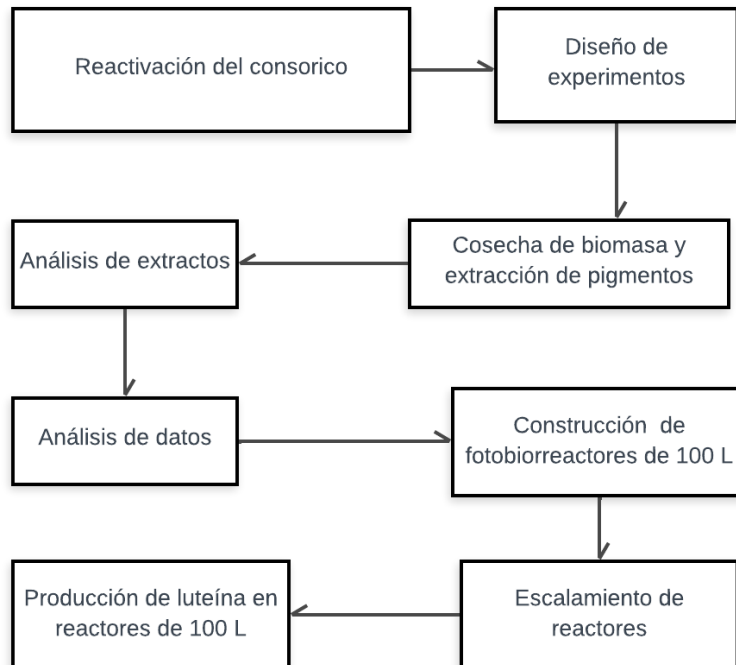


Figura 4.1. Diseño general de la parte experimental.

4.3 Consorcio y pre-cultivo

El consorcio BR-UANL-01 proporcionado por la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, fue cultivado en un fotobiorreactor de vidrio transparente con capacidad de 7 L (25 cm de diámetro interior y 40 cm de alto) el cual contenía 5 L de agua destilada con solución nutritiva LC (López-Chuken y Young, 2010) la cual está compuesta de: KNO_3 5 mM, KH_2PO_4 1mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mM, H_3BO_3 46 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9.15 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 765 nM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 320 nM, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 nM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y Na_2EDTA 20 μM , como medio de cultivo. Este fotobiorreactor fue inoculado con 150 mL del cultivo a un flujo de fotones de 44 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con fotoperiodos de 12-12 h luz-oscuridad. Al fotobiorreactor se le suministró aire atmosférico previamente filtrado a 0.45 μm (Millipore Millex-HV) proveniente de una bomba para acuario (ELITE 802) a 0.5 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), para proveer al cultivo con CO_2 atmosférico. El fotobiorreactor puede observarse en la **Figura 4.2**. La fertilización de este reactor se realizó de acuerdo con la disminución de la conductividad eléctrica, dicho proceso se llevó a cabo con la solución nutritiva LC y se mantuvo el volumen por pérdida por evaporación con agua destilada.

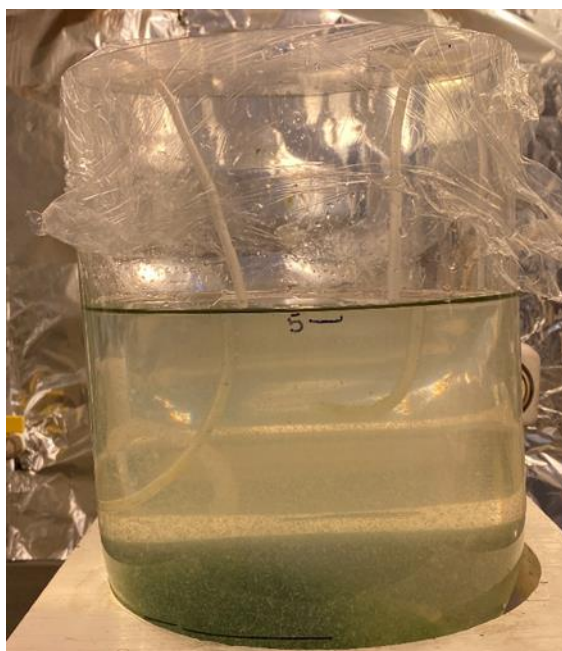


Figura 4.2. Imagen de fotobiorreactor de 5 L, con agua destilada y solución LC.

4.4 Determinación de la concentración de biomasa

4.4.1 Peso seco

La cuantificación de la biomasa de microalgas se realizó en peso seco utilizando una estufa de convección Quincy Lab. Inc. 40GL. Para lo cual se tomó un volumen de 1 mL el cual fue depositado en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante por 24 h a 37°C. El peso seco se calculó mediante la diferencia del peso inicial de la charola y el peso final (peso de la charola con biomasa) posterior al secado a 24 h a 37°C.

4.4.2 Relación biomasa medio de crecimiento

Esta cuantificación se realizó tomando una muestra del medio mezclado de 80 mL, posteriormente fue vertido en un cono Imhoff. Se esperó 5 min para tomar la lectura de los mL ocupados por la biomasa y se utilizó en la **ecuación 4.1**.

$$RBM = \frac{Bm}{md} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Dónde *RBM* es la relación entre la biomasa y el medio de crecimiento, *Bm* son los mL ocupados por la biomasa en el cono Imhoff y *md* son los mL totales de la muestra tomada.

4.5 Porcentaje de floculación

Para la determinación de la capacidad de floculación se utilizó la metodología seguida por Beltrán-Rocha, 2017, dónde primeramente se retiró la aireación de los fotobiorreactores dejando los cultivos en estado estático (según el tiempo requerido en la prueba). Posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL a 2/3 de la profundidad del fotobiorreactor utilizado (para fotobiorreactores de 1 L a 7 cm de la base; de 5 L a 11 cm de la base y en caso del reactor de 100 L, se tomó una muestra de 500 mL, a una distancia de 50 cm desde la parte superior del reactor). El porcentaje de la capacidad de floculación se calculó de acuerdo con la **ecuación 4.2**.

$$\% \text{ de Floculación} = 100\% - (A \times 100\% / B) \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Donde A es el peso en g (BS)/L de la biomasa de microalgas suspendida después del tiempo de reposo (*i.e.* estado estático del cultivo), B es el 100% de la biomasa de microalgas suspendida en g (BS)/L.

4.6 Operación de fotobiorreactores en condiciones de estrés lumínico

Para los fotobiorreactores en condiciones de estrés se utilizó agua residual tratada (ART) como medio de cultivo, la cual fue proporcionada por la Planta de Tratamiento Norte, del municipio de General Escobedo N.L., México. Sus características son mostradas en la **tabla 4.1**. El consorcio fue cultivado en cilindros transparentes con capacidad de 1 L, por triplicado, el inóculo fue de 75 mL (10% del volumen), correspondiente a 0.375 g DCW/L, el resto fue ART para completar un volumen total de 750 mL. Los fotobiorreactores y sus réplicas fueron puestos dentro de cajas de cartón (0.39×0.32.5×0.185 m) recubiertas con pintura blanca antibacterial con el objetivo de reflejar la mayor cantidad de luz provenientes de focos LED (Linval) colocados en la parte superior del interior de las cajas (**Figura 4.3** y **4.4**). Las condiciones de iluminación fueron divididas en 3 categorías con dos niveles bajo y alto: intensidad 480 lm y 1500 lm, fotoperiodos 12-12 h luz-oscuridad y 24-0 h luz-oscuridad, y color de la luz, cálido (3000 K) y frío (6500 K). Se proporcionó aire atmosférico previamente filtrado a 0.45 μ m (Millipore Millex-HV) proveniente de una bomba (EcoAir7, USA) a 0.5 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), para proveer al cultivo con CO₂ atmosférico. La biomasa de microalgas fue cultivada durante 30 días. Posteriormente se cosechó retirando la aireación de los fotobiorreactores, para permitir la sedimentación. Posteriormente, el agua fue decantada y se recuperó la biomasa en tubos falcon de 50 mL. Para el monitoreo de pH y conductividad eléctrica se utilizó un potenciómetro multiparamétrico de campo (Apera instruments).

Para determinar la eficiencia de remoción de NO₃⁻, se utilizó el método de sulfato de brucina descrito en la NMX-AA-079-SCFI-2001 y para la remoción de PO₄³⁻, se seleccionó el método de ácido de vanadomolibdofosforico descrito en la NMX-AA-029-SCFI-2001 y se corroboró a través de kits de prueba de fosfatos (API Aquarium y HACH). El rendimiento de la remoción está dado por la **ecuación 4.3** (Sforza *et al.*, 2018), dónde se relaciona la diferencia de concentración de nutrientes (NO₃⁻ o PO₄³⁻) y la diferencia de concentración de biomasa en cada etapa; es decir, el sustrato utilizado para el crecimiento de la biomasa en cada etapa. Por otro lado, la tasa de remoción está dada por la **ecuación 4.4** (Rezvani *et al.*, 2018). Ésta

relaciona la diferencia de nutrientes en un lapso determinado, es decir, la cantidad de sustrato consumido diariamente durante las etapas de escalamiento e inducción de estrés.

$$Y_{s/x} = -\frac{Cs_f - Cs_i}{Cx_f - Cx_i} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Dónde $Y_{s/x}$ es el rendimiento dado en mg s/mg DCW, Cs_f es la concentración de nutriente (NO_3^- o PO_4^{3-}) final dado en mg s/L y Cs_i concentración de nutriente inicial en mg/L, Cx_f y Cx_i son concentraciones de biomasa final e inicial respectivamente en mg/L.

$$Tr = \frac{Cs_i - Cs_f}{t_f - t_i} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Dónde Tr es la tasa de remoción de contaminante en mg/L/d y t_f y t_i es tiempo inicial y final respectivamente.

Los experimentos se realizaron por triplicado y son expresados en promedios junto con sus desviaciones estándar.

Tabla 4. 1. Características del agua residual tratada, utilizada como medio de cultivo.

Parámetro	Valor
SST	22.97
Sólidos sedimentables	0.13
DQO	81.46
N orgánico	4.06
P total	1.25
Coliformes totales	1,212

Todos los parámetros son expresados en mg/L excepto los sólidos sedimentables y coliformes totales los cuales son medidos en mL/L y NMP/100 mL respectivamente.

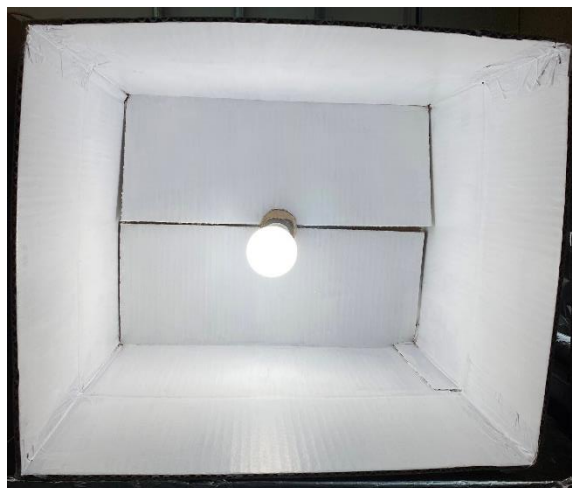


Figura 4.3. Recubrimiento interior de la cámara de iluminación.

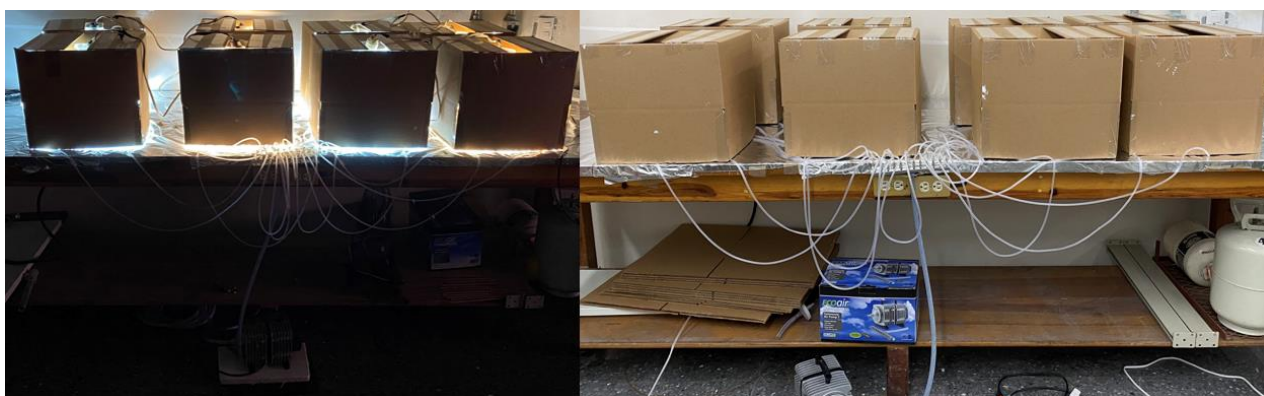


Figura 4.4. Cámaras de iluminación.

4.7 Extracción de pigmentos

Para la extracción de pigmentos, se siguió el protocolo modificado de Bligh y Dyer (1959); el cual consiste en la extracción de ácidos grasos de la biomasa con una mezcla de solventes. Para esto se mezcló cloroformo-metanol-agua en proporciones 2: 2: 1.8 V/V en un embudo de separación. Éste fue agitado vigorosamente y después se liberaron los vapores de los solventes. Se dejó reposar durante 24 h en ausencia de luz, debido a la naturaleza fotosensible de los compuestos. Posteriormente, la fase inferior compuesta de cloroformo y los pigmentos fue recuperada. Finalmente se tomaron 7 mL del extracto, se evaporó el cloroformo con N_2 gas de alta pureza, y el extracto fue resuspendido en metanol y almacenado a 4 °C para análisis posteriores.

4.8 Análisis UHPLC

La detección de los carotenoides se realizó a través de un equipo UHPLC (Prominence i LC-2030c) con una columna C18 (Shimadzu nexcol). Siguiendo el método reportado por Jin *et al.*, 2017 en dónde se utilizó una fase móvil compuesta de metanol (A) y acetonitrilo (B) con un gradiente de elución de 10% de metanol y 90% de acetonitrilo al inicio del análisis, seguido por un gradiente lineal de 0% de metanol y 100% de acetonitrilo (4-12 min), regresando a 10% de metanol y 90% de acetonitrilo (12.1-15 min). El volumen de inyección fue de 5 μ L, siendo separados los carotenoides con un flujo de 0.2 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo en 35°C. La detección de los analitos eluidos se realizó con un detector UV a 450 nm.

4.9 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Para determinar los efectos de las interacciones de las intensidades lumínicas, los fotoperiodos y la coloración de la luz, en la generación de pigmentos y biomasa, fue realizado un diseño factorial 2³, el cual es resumido en la **tabla 4.2**. Este diseño constó de 8 experimentos, con 3 réplicas, para un total 24 experimentos para optimizar los niveles de las variables seleccionadas. Los datos se procesaron utilizando un paquete estadístico comercial, Minitab 18 y el ajuste del modelo se validó usando un Análisis de Varianza ANOVA. También se realizó una prueba de Kruskal Wallis, con el objetivo de determinar si existe diferencia significativa entre las medianas de los grupos de datos.

Tabla 4.2 Resumen del diseño de experimentos factorial completo 2³.

Factores de iluminación	Bajo	Alto
Intensidad	480 lm	1500 lm
Fotoperiodos (Luz: Oscuridad) h	12:12	24:0
Color	Cálido (3000 K)	Frío (6500 K)
Datos estadísticos		
Corrida base		8
Bloques base		1
Réplicas		3
Total de corridas		24
Total de bloques		1

4.10 Escalamiento

4.10.1 Construcción

Para el escalado fue utilizado tereftalato de polietileno (PET) para los fotobiorreactores tanto de 1L como de 5 L (**figura 4.5**), por otro lado para el fotobiorreactor de 100L se diseñó una batería de fotobiorreactores de tipo columna de burbujeo, con una capacidad de 25 L cada uno, para un total de 100 L (1.9 m de alto \times 15 cm de diámetro, con 3 mm de espesor) (**figura 4.5**). El material utilizado para estos fotobiorreactores fue acrílico transparente para permitir el paso de luz, con un embudo de metal en la parte inferior. Estos fueron dispuestos en una estructura de hierro, soportados en una tabla perforada recubierta de pintura impermeable.



Figura 4.5. Fotobiorreactores utilizados A) fotobiorreactor de 1 L, B) fotobiorreactor de 5 L, C) batería de fotobiorreactores 25 L c/u.

Para permitir la formación de burbujas en el reactor, se construyó un dispositivo de aireación con cloruro de polivinilo (PVC) (**figura 4.6**), al cual le fueron conectadas mangueras para hacer circular el aire proveniente de un distribuidor fabricado con PVC (**figura 4.7**). El aire fue abastecido con una bomba marca ECOair7 de 6.96 PSI, para conocer la cantidad de aire suministrado se incluyeron rotámetros al sistema. La iluminación se realizó con barras de luz

LED marca MLESSO, colocadas en la superficie de los reactores. Los fotoperiodos fueron controlados con un temporizador marca INTERMATIC.



Figura 4.6. Dispositivo de aireación. A) vista superior, B) vista lateral, C) dispositivo conectado.



Figura 4.7. Distribuidor de aire.

4.10.2 Operación

En esta etapa se aumentó gradualmente el volumen de los fotobiorreactores. Éstos se inocularon con 10% del volumen de biomasa húmeda (Sandhya, *et al.*, 2016), el resto fue ART. Durante el escalado se mantuvieron las condiciones óptimas de iluminación encontradas en el DOE. Respecto al volumen de los fotobiorreactores, este fue 1L, 5L y 100L tras 14 días. Las condiciones utilizadas durante la fase de escalado se muestran en la **tabla 4.3**. Al término de la etapa de escalado se continuó con una fase de estrés donde fueron modificados los fotoperiodos (Minhas *et al.*, 2020) durante un lapso de 15 días (Lee *et al.*, 2018) las condiciones de esta etapa son mostradas en la **tabla 4.3**. Se determinó la cantidad de biomasa inoculada y el aumento de ésta a través del análisis de peso seco, como es descrito en el **punto 4.4.1**. Aunado a este análisis en la batería de fotobiorreactores de 100 L se midió la relación biomasa medio de crecimiento como es descrito en el **punto 4.4.2**, y así mismo fue determinada la remoción de nutrientes como se mencionó en el **punto 4.6**. Al término de

la etapa de inducción de estrés se realizó la extracción de pigmentos como fue descrito en el **punto 4.7**, recuperando la biomasa. Finalmente, los extractos se analizaron según lo descrito en el **punto 4.8**.

Tabla 4.3. Condiciones utilizadas durante el escalado e inducción de estrés.

Parámetro	Escalamiento 100 L	Estrés 100 L
Fotoperiodos (h) L/O	12: 12	24: 0
Flujo de fotones ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		116.12
Flujo de aire (L/min)		8

4.10.3 Cinética de crecimiento

Con los valores obtenidos a partir de la relación de biomasa y medio de crecimiento se realizó una cinética que sigue el modelo logístico modificado (**ecuación 4.5**) (Dammak *et al.*, 2018) el cual se ajusta un 99.75%.

$$X(t) = X_0 + \frac{X_m - X_0}{1 + e^{\left[\left(\frac{4 \cdot \mu}{X_m - X_0}\right) \cdot (\lambda - t) + 2\right]}} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

En donde $X(t)$ es la concentración de biomasa respecto al tiempo, X_0 y X_m son la concentración inicial y máxima de biomasa respectivamente (mL/ mL), μ (d-1) es la tasa de crecimiento específico para el consorcio BR-UANL-01, t es el tiempo (d) y λ es la duración de la fase de latencia (d).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Reactivación del Consorcio BR-UANL-01

5.1.1 Monitoreo de parámetros (Reactivación)

La **figura 5.1** muestra los valores de monitoreo del pH y los valores del monitoreo de la conductividad eléctrica en el reactor de 5L para la reactivación del consorcio. En trabajos previos del grupo de investigación se ha definido que un aumento en el pH y una disminución en la conductividad eléctrica, indican el crecimiento de la biomasa en el fotobiorreactor (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017a).

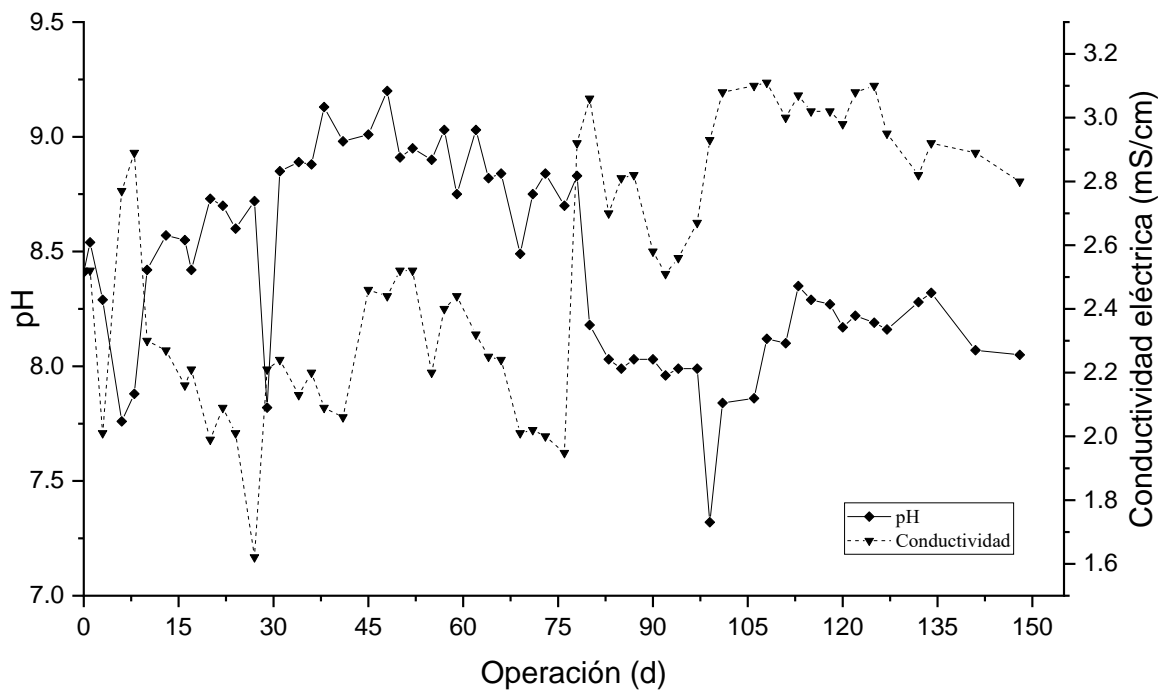


Figura 5.1. Valores de monitoreo de pH y conductividad eléctrica, en fotobiorreactor de 5 L durante la etapa de reactivación ($n = 3$) \pm error estándar (EE).

Como se puede apreciar en la **figura 5.1**, se presenta un comportamiento relacionado entre estos parámetros, ya que el pH al presentar un incremento, en la conductividad eléctrica se observa un descenso, se pueden apreciar descensos muy marcados, en el día 3 de operación

se puede observar una disminución que representa un equivalente al 20.7% de disminución de la conductividad eléctrica y un aumento del pH en 0.10 unidades así como al día 27 de operación se registró un valor de $1.4 \mu\text{S}/\text{cm}$, equivalente a una disminución del 36.5% en el caso del pH este aumento en 0.30 unidades, sin embargo el día crítico para el parámetro de pH fue el día de operación 38, en dónde se registró un incremento de 0.72 unidades, por otro lado, la conductividad registró un valor de $2.09 \mu\text{S}/\text{cm}$, correspondiente a una disminución de un 17%. En el caso del pH, el incremento puede deberse al ion OH^- el cual es un subproducto resultado de la actividad fotosintética y también a la asimilación del NH_4^+ ya que al ser consumido por la microalga este es transformado en NH_3 el cual incrementa este parámetro (Kube *et al.*, 2018). De acuerdo con Beltrán-Rocha *et al.*, (2017a), una de las razones por las cuales se presenta un descenso en la conductividad eléctrica es debido al agotamiento de los nutrientes inorgánicos, tales como, las sales de fósforo, calcio, magnesio y cobre, sales presentes en la solución nutritiva LC. Además de registrar el crecimiento con los parámetros de monitoreo, éste pudo observarse con el incremento en la coloración del fotobiorreactor (**figura 5.2**) y con el análisis de peso seco, donde se presentó un incremento en la concentración pasando de 0.26 ± 0.018 a 2.45 ± 0.03 g DCW/L.

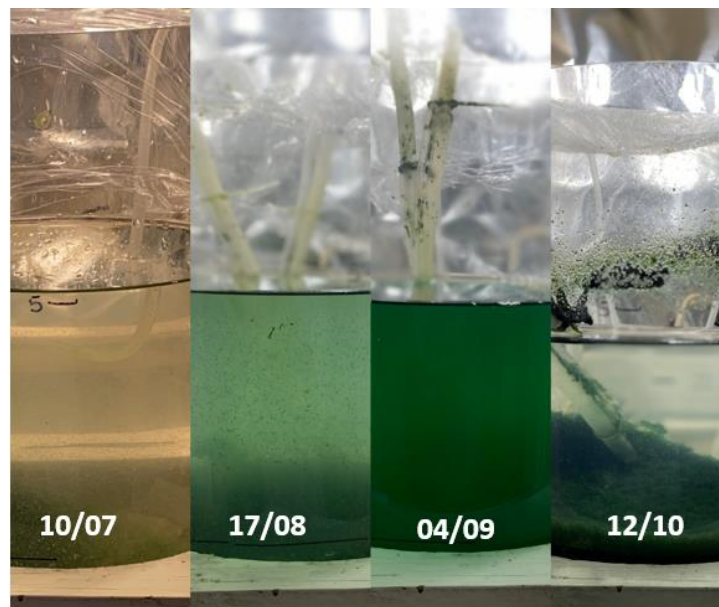


Figura 5.2. Crecimiento de biomasa en fotobiorreactores, con agua destilada y solución LC como medio de cultivo, en la parte inferior de cada imagen del fotobiorreactor está la fecha en que fue tomada la foto.

Las **figuras 5.3 a 5.5** muestran la composición microscópica del consorcio BR-UANL-01. En la **figura 5.4** se observa la microalga *Scenedesmus dimorphus*, que se caracteriza por tener entre 4 y 8 células juntas. También se aprecia la cianobacteria *Leptolyngbya sp.* Esta cianobacteria se caracteriza por células dispuestas una tras otra formando agregados alargados y la microalga *Chlorella sp.* a un lado de *Leptolyngbya sp.* de forma esférica la cual puede encontrarse formando agregados o como células solitarias. En la **figura 5.5**, se aprecia el predominio de *Leptolyngbya sp.* en el sobrenadante, de igual forma se pueden observar células de *S. dimorphus* en el centro.

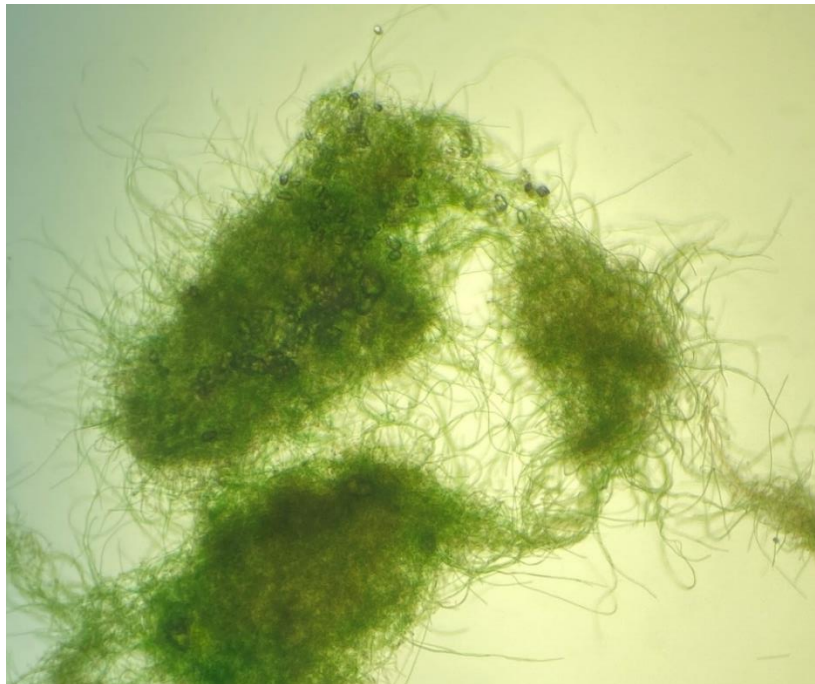


Figura 5.3. Flóculo del consorcio BR-UANL-01, durante el DOE visto en el microscopio a 10x.



Figura 5.4. Micrografía de las microalgas detectadas después del DOE: 1) *Scenedesmus dimorphus*, 2) *Leptolybya* sp. 3) *Chlorella* sp. A 40x



Figura 5.5. Micrografía del sobrenadante del reactor madre durante la fase de activación a 10x.

De acuerdo con Hu *et al.*, 2019, Alam *et al.*, 2020 y Zheng *et al.*, 2022, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. son géneros capaces de sintetizar luteína naturalmente son capaces de incrementar la concentración del pigmento bajo estrés fotooxidativo, generando acumulación

considerable. Por otra parte, no se tiene evidencia de que *Leptolyngbya* sp. sea un género que sintetice luteína, sin embargo, de acuerdo con Borowitzka, 2013 y Tsolcha *et al.*, 2017, es capaz de fijar el Nitrógeno y el Fosforo de las aguas con exceso de nutrientes, además de generar ficoeritrina y exopolisacaridos los cuales pueden ser utilizados con fines terapéuticos (Bellezza *et al.*, 2003; Vijayakumar y Menakha, 2015; Trabelsi *et al.*, 2016).

5.2 Diseño de Experimentos (DOE)

Para el DOE fueron escogidos parámetros de iluminación, esto con el objetivo de disminuir en la medida de lo posible la cantidad de reactivos químicos utilizados durante la investigación, y apegar el proceso a los principios de economía circular al no utilizar materias primas, y a su vez, cumplir las Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-2021 y NOM-002-SEMARNAT-1996, debido a la naturaleza del medio de cultivo utilizado (ART). Por tal motivo, la adición sales o nutrientes para estresar las células cambiaría la composición del efluente, incumpliendo las normas antes mencionadas. La identificación de los reactores se realizó con base en los parámetros de iluminación elegidos, primero fue la intensidad: 5W o 15W, seguido del fotoperiodo: 12 o 24 h y, por último el color de la fuente de iluminación: Cálido (C) o Frío (F).

En la **figura 5.6** pueden apreciarse los cambios en la biomasa después de las diferentes interacciones entre los parámetros de iluminación. Como se puede observar, hay un cambio en la coloración de la biomasa en todos los casos, sin embargo, los tratamientos 15W/24/C, 5W/24/F y 15W/24/F resaltan por su tonalidad anaranjada/amarillenta en algunas partes de la biomasa.

De acuerdo con Zheng *et al.*, (2022) los carotenoides son la mejor defensa contra el estrés oxidativo y el cambio en la coloración en las células es respuesta a dicho estrés. Para evitar el daño por exposición lumínica, los pigmentos incrementan su presencia cerca de los fotosistemas, al ser éstos últimos un componente clave en la fotosíntesis, debido a que funcionan como conductores de la energía luminosa a las moléculas de clorofila (chl) *a* en los centros de reacción de las dos unidades fotosintéticas: fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) (Mirkovic *et al.* 2017).

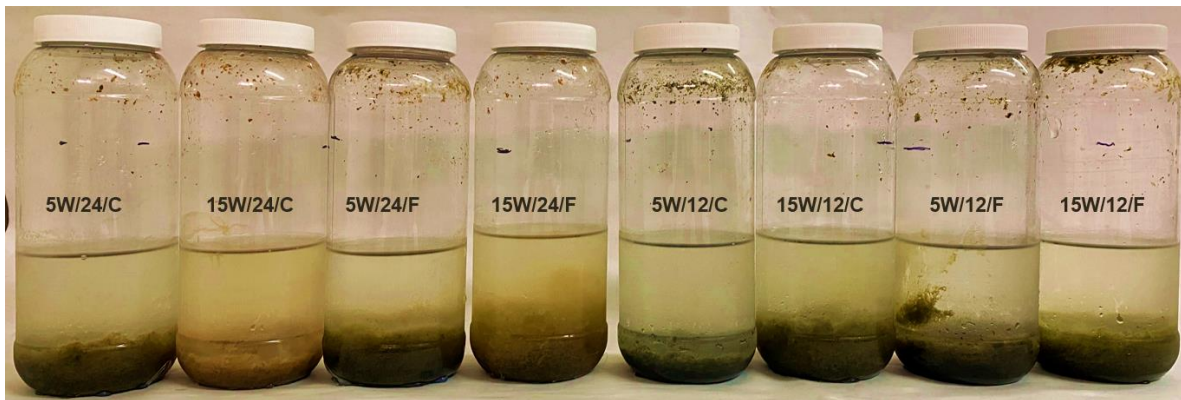


Figura 5.6. Cambios en la coloración de la biomasa en los diferentes tratamientos del DOE, con agua residual tratada.

De acuerdo con su función como conductores de fotones, existen tres grupos importantes de pigmentos en la fotosíntesis: Clorofilas, Carotenoides y Ficobilinas. Algunos carotenoides cumplen el rol de protectores contra el daño por exceso de iluminación (fotones), reprimiendo selectivamente chl *a* de estado triplete, previniendo la formación de un oxígeno singlete, el cual es una especie reactiva del oxígeno dañina para la célula (Lehmuskero, Chauton y Boström, 2018). También hay que recalcar que en todos los tratamientos se conservó la característica autofloculante del consorcio BR-UANL-01.

5.2.1 Monitoreo de parámetros (DOE)

Durante el DOE, al igual que en la fase anterior, fueron monitoreados tanto el pH como la conductividad eléctrica. Los resultados se muestran en las **figuras 5.7** y **5.8**.

En la **figura 5.7** se puede apreciar que, tanto el conjunto de tratamientos 15W/12/C y 15W/12/F, así como el tratamientos 5W/24/F y 5W/24/C, tienen el mismo comportamiento hasta el día 18. Posterior a este día, hubo pequeñas variaciones en los conjuntos de tratamientos respecto al parámetro de pH. Como se puede observar en la mayoría de los tratamientos hay un incremento del pH hasta el día 9, exceptuando el tratamiento 15W/24/F el cual registró el pico más alto el día 4. El valor de pH más alto fue obtenido con el tratamiento 15W/12/C, alcanzando 10.22 el día 9 de operación. Cabe mencionar que tanto el tratamiento 15W/12/C como el tratamiento 15W/12/F sobrepasaron el límite máximo permitido de potencial de hidrógeno establecido por la NOM-001-SEMARNAT-2021, desde el día 6 de operación, recuperándose al día 10 de operación. Posterior al día 9 de operación,

todos los fotobiorreactores presentaron una estabilización en los valores de pH, lo cual puede relacionarse con la fase estacionaria del crecimiento de biomasa.

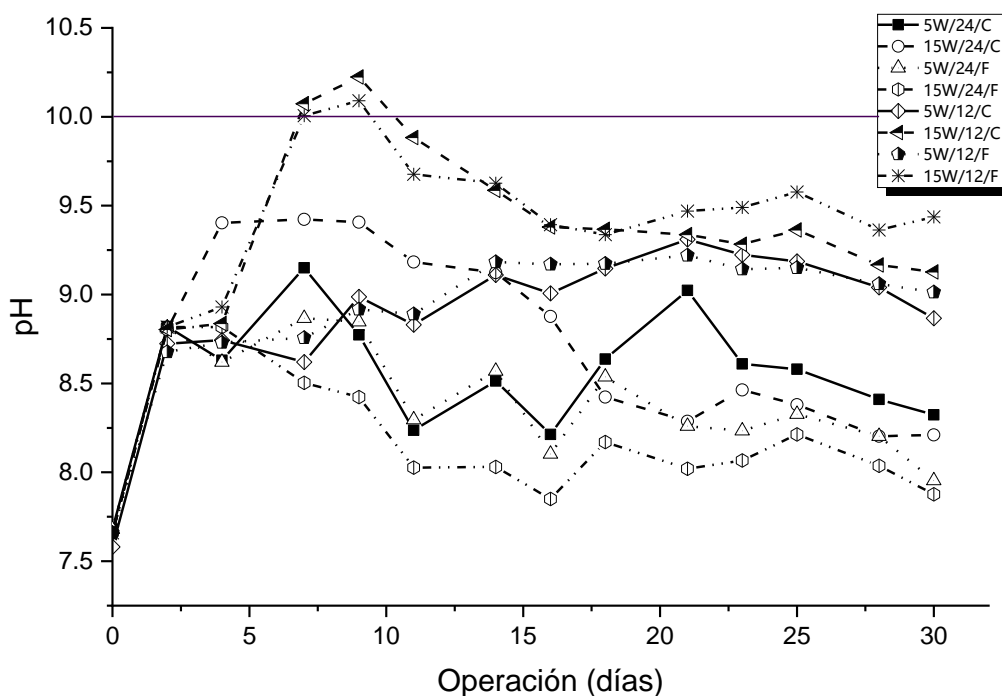
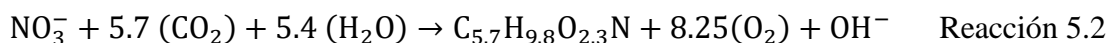


Figura 5.7. Datos correspondientes al monitoreo de pH en fotobiorreactores del DOE. Promedio (n = 3) ± EE.

Durante el crecimiento de microalgas es común que se presente una fase de adaptación, seguido de un incremento del pH, al inicio de la actividad fotosintética. Esto como resultado del incremento en los niveles de OH^- en el medio por consumo del HCO_3^- que aporta el CO_2 , necesario para el crecimiento de la biomasa. Así como la asimilación del NO_3^- también produce equivalentemente OH^- , de acuerdo con las reacciones 5.1 y 5.2 (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017a).



Por esta razón, el aumento de los valores pH en el medio se relacionan con la actividad metabólica del consorcio. Debido a esto algunos microorganismos fotosintéticos al metabolizar los nutrientes y fijar el CO_2 , alcalinizan el medio (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017a; Gonçalves, Pires y Simões, 2017).

En la **figura 5.8** se puede observar un comportamiento similar en todos los tratamientos del DOE, los cuales tienen un marcado descenso en la conductividad eléctrica al día 4 de operación, excepto por el tratamiento 5W/12/F, que presentó un moderado descenso en la conductividad eléctrica hasta el día 9 de operación, día en el que todos los tratamientos se estabilizaron.

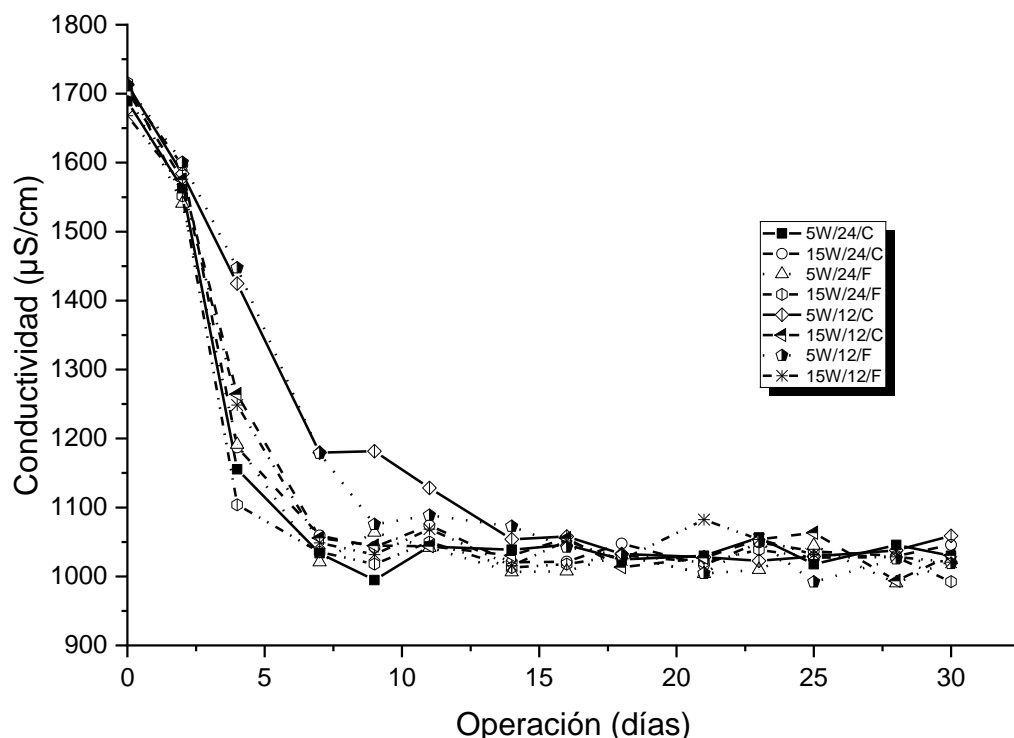


Figura 5.8. Datos correspondientes al monitoreo de Conductividad eléctrica en fotobiorreactores del DOE. Promedio (n = 3) ± EE.

5.2.2 Determinación de iones de nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-})

Los resultados de la determinación de NO_3^- y PO_4^{3-} en el medio al término del DOE, así como los porcentajes de remoción por tratamiento son presentados en la **tabla 5.1**.

Tabla 5. 1. Remoción de PO_4^{3-} y NO_3^- , en cada tratamiento del DOE.

Tratamiento	PO_4^{3-} (mg/L)		NO_3^- (mg/L)		
	Inicial	Final	inicial	final	% de remoción
5W/24/C	5	N.D.	5.83	0.26 ± 0.02	95.5 ± 0.30
15W/24/C	5	N.D.	5.83	0.85 ± 0.00	85.4 ± 0.00
5W/24/F	5	N.D.	5.83	0.30 ± 0.03	94.9 ± 0.61
15W/24/F	5	N.D.	5.83	0.91 ± 0.10	84.3 ± 1.52

5W/12/C	5	N.D.	5.83	0.69 ± 0.10	88.2 ± 1.52
15W/12/C	5	N.D.	5.83	0.84 ± 0.05	85.6 ± 0.91
5W/12/F	5	N.D.	5.83	0.61 ± 0.10	89.5 ± 1.52
15W/12/F	5	N.D.	5.83	0.90 ± 0.00	84.5 ± 0.00

N.D.: No detectado en la muestra, Límite de detección <0.02 ppm, (n = 3) ± EE.

Se puede observar que el tratamiento con un mayor porcentaje de remoción de NO_3^- fue el 5W/24/C, seguido del 5W/24/F. Se destaca el hecho de que todos los tratamientos mostraron una remoción por encima del 80%.

En la investigación realizada por De Bhowmick *et al.*, (2019), se logró una remoción de nitratos en un 85%, utilizando *Chlorella minutissima*. Por otro lado, en la investigación hecha por Cavieres *et al.*, (2021) se obtuvo un 99% de remoción de Nitrógeno total con *Muriellopsis* sp. y 96% con *Scenedesmus almeriensis*, en reactores de 1 L. En la investigación realizada por Arashiro *et al.*, (2020) se obtuvo una remoción de nitrato de 91.6 y 92.8% con *Nostoc* sp y *Arthrospira platensis*, con un medio de cultivo BG11 con 50% de agua residual. Estos valores son similares a los obtenidos en esta investigación con el consorcio BR-UANL-01.

Debido a que el Nitrógeno es uno de los nutrientes principales para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, ATP y enzimas, en la naturaleza éste puede estar disponible en una variedad de formas biológicas como: urea, amoníaco y peptonas (Shahid *et al.*, 2020; Minhas *et al.*, 2016). La asimilación de este nutriente que realizan las microalgas requiere nitrógeno inorgánico el cual debe estar sólo en forma de amonio NH_4^+ , nitrato NO_3^- y nitrito NO_2^- . Estos últimos son reducidos con la ayuda de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa, respectivamente. La nitrato reductasa utiliza la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) para transferir dos electrones, lo que resulta en la conversión de nitrato en nitrito. El nitrito se reduce a amonio por la nitrito reductasa y la ferredoxina (Fd), transfiriendo un total de seis electrones en la reacción. Por tanto, todas las formas de Nitrógeno inorgánico se reducen finalmente a amonio, antes de incorporarse a los aminoácidos dentro del fluido intracelular. Finalmente, utilizando glutamato (Glu) y trifosfato de adenosina (ATP), la glutamina sintasa facilita la incorporación del amonio al aminoácido glutamina (Mohsenpour *et al.*, 2021).

Las determinaciones de PO_4^{3-} , no detectaron presencia de este nutriente por lo que se infiere que fue completamente asimilado por las microalgas. En la investigación realizada por Arashiro *et al.*, (2020), todos los tratamientos, tanto con *Nostoc* sp., *A. platensis* y *Porphyridium purpureum*, en mezclas tanto de 50 y 75% de agua residual con medio de cultivo BG11, se obtuvo una remoción de entre el 91 al 99% de remoción de fosfatos del medio.

Al igual que el nitrato, el fosfato es un nutriente clave en el metabolismo de las macro y microalgas, ya que se encuentra dentro de los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y los intermediarios del metabolismo de los carbohidratos (Kube *et al.*, 2018). La falta de este nutriente conduce a la acumulación de carbono orgánico y a la disminución de la división celular. Se sabe que deficiencias en este nutriente provocan en la célula afectaciones en los procesos que requieren energía como la síntesis de proteínas, la transcripción y el ciclo del carbono. Durante el metabolismo de las microalgas, éste es incorporado a compuestos orgánicos a través de la fosforilación, la cual involucra la generación de adenosín trifosfato (ATP) a partir de adenosín difosfato (ADP), acompañado de una forma de entrada de energía (Mohsenpour *et al.*, 2021). Este aporte energético puede provenir de la oxidación de sustratos en la respiración, en el caso del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias o en la fotosíntesis de la luz, como es el caso. Los fosfatos se transfieren mediante transporte energizado, a través de la membrana plasmática de la célula de las algas (Shahid *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2013).

5.2.3 Extracción de luteína, análisis cromatográfico e incremento de biomasa

Al término del DOE se extrajeron los pigmentos de cada uno de los tratamientos de acuerdo con lo descrito en el **punto 4.5**. Los resultados del análisis UHPLC y la determinación de peso seco (DCW) se muestran en la **tabla 5.2** y en la **figura 5.9**, donde se puede observar que el tratamiento 15/12/C obtuvo una concentración de luteína de 21.12 mg/g, así como el tratamiento 15/12/C obtuvo la producción de luteína de 2.45 mg/L/d. Por otro lado, referente a la biomasa, el tratamiento 5/12/F fue el que tuvo un mayor incremento de biomasa alcanzando 4.8 g DCW/L y una producción de 0.16 g DCW/L/d; sin embargo, este tratamiento fue el que menor concentración de luteína generó.

Tabla 5. 2 Resultados de concentración de luteína e incremento de biomasa en el DOE.

Tratamiento	Luteína		Biomasa	
	Concentración (mg/g)	Productividad (mg/L/d)	Concentración (g DCW/L)	Productividad (g DCW/L/d)
5/24/C	12.81 ± 3.30	1.52 ± 0.27	3.63 ± 0.4	0.121 ± 0.013
15/24/C	12.84 ± 5.40	1.97 ± 0.78	4.66 ± 0.64	0.156 ± 0.022
5/24/F	13.79 ± 2.34	1.92 ± 0.19	4.23 ± 0.57	0.141 ± 0.019
15/24/F	11.06 ± 3.93	1.66 ± 0.44	4.6 ± 0.46	0.153 ± 0.015
5/12/C	18.25 ± 5.45	2.45 ± 1.93	4.16 ± 0.20	0.139 ± 0.008
15/12/C	21.12 ± 7.21	1.73 ± 1.73	3.26 ± 0.73	0.109 ± 0.025
5/12/F	10.52 ± 5.72	2.28 ± 2.28	4.8 ± 0.81	0.160 ± 0.027
15/12/F	13.04 ± 2.87	1.85 ± 1.85	4.23 ± 0.37	0.141 ± 0.013

Promedio (n = 3) ± EE.

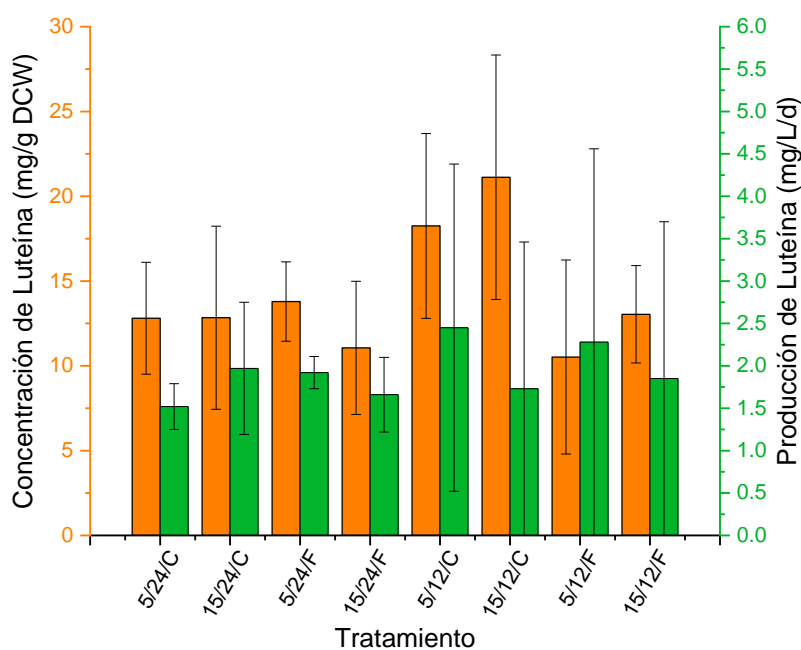


Figura 5.9. Concentración y producción de luteína en DOE, Promedio (n = 3) ± EE .

En la investigación realizada por Chen *et al.*, 2017 realizaron una optimización en la concentración de acetato y nitrato en el medio de crecimiento, con el objetivo de incrementar la síntesis de luteína. Utilizaron medio basal (BM), medio bold basal modificado (MBBM), medio de Bristol modificado (MBM) y medio BG-11 un flujo de fotones de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obteniendo un contenido de luteína de 1.78, 2.29, 2.3 y 2.57 mg/g, así como, una

productividad de 2.19, 2.96, 3.09 y 3.39 mg/L/día de luteína en el caso de la biomasa se reportó la productividad de 1.23, 1.35, 1.29 y 1.32 g/L/d en cada uno de los medios respectivamente utilizando *C. sorokiniana* Mb-1. En el estudio realizado por Chen *et al.*, 2019, utilizando una cepa mutante de *C. sorokiniana* MB-1-M12, utilizando un reactor semicontinuo con un recambio de medio BG-11 del 75%, se logró producir una concentración de biomasa de 2.44 g/L con una producción de 1.78 g/L/d con 4.98 mg/g de luteína, con una producción de 6.61 mg/L/d y en cultivo batch se reportó concentración de 2.76 g/L con una producción de 1.25 g/L/d de biomasa y 7.39 mg/g, con una producción de 3.43 mg/L/d de luteína. Zhao *et al.*, 2019, por su parte, estudiaron estrategias relacionadas con la calidad de la luz y la temperatura para la producción de luteína, utilizando *Chlamydomonas* sp. JSC4. Probaron con cuatro colores de luces LED (blanca, verde, azul y rojo) con una intensidad de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con una temperatura inicial de 25 o 35 °C, logrando una productividad de biomasa de 766 mg/L/d y una acumulación de 4.24 mg/g, con una productividad de 3.25 mg/L/d de luteína con una mezcla de luz blanca y azul 3:1. En la investigación realizada por Ma *et al.*, 2021, fue utilizada una cepa de *C. sorokiniana* FZU60 cultivada en diferentes estrategias de cultivo para la generación de luteína y otros metabolitos, siendo el déficit de nitrógeno en cultivo batch la estrategia de cultivo que tuvo una mayor producción de luteína, obteniendo 7.72 mg/g de luteína, con una producción de 1.75 g/L de biomasa. Por otro lado, Zheng *et al.*, 2022, utilizaron agua residual con almidón de maíz, con el objetivo de incrementar la concentración de luteína en *C. sorokiniana* FACHB-275 con fotoperiodos de 24 h y una iluminación de 1200 lux ($66 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obteniendo con ello 1.31 g/L de biomasa y una acumulación de luteína de 10.89 mg/g en un periodo de 6 días.

La producción de pigmentos en microalgas varía no solamente entre especies, sino también dependiendo de factores como la intensidad de iluminación, la disponibilidad de nitrógeno, el estado del cultivo y la composición del medio. Del Campo *et al.*, 2000, mencionan que el contenido de luteína en *Muriellopsis* sp., incrementa en la fase exponencial, iniciando la fase lag del crecimiento microbiano y disminuye con la asimilación de nitrógeno. Araujo *et al.*, 2009, reportan que el máximo contenido de carotenoides y clorofila en *Dunaliella salina* fue registrado al inicio de la fase estacionaria del crecimiento. En el caso de Bar *et al.*, 1995, se refieren que con *C. zofingiensis* el contenido de pigmentos disminuye cuando existe una

combinación de alta intensidad lumínica y deficiencia de nitrógeno. En consecuencia, a una baja eficiencia fotosintética y disminución de la fijación de CO₂ durante el período déficit de nitrógeno, los compuestos ricos en energía, como el almidón y los lípidos, son sintetizados primero para reservar energía y superar el estrés ambiental, resultando en posible degradación y uso de luteína para la síntesis de compuestos ricos en energía, o los procesos sintéticos de luteína podrían retrasarse debido a una disminución en los niveles de proteínas, lo que resultaría en una fotosíntesis menos eficiente (Xie *et al.*, 2020). Dinh *et al.*, (2022) mencionan que la cantidad de xantofilas primarias en microalgas, como la luteína, tiende a disminuir con alta intensidad de luz, por encima de 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Otros estudios también concluyeron en que la disminución en el contenido de luteína bajo iluminación de alta intensidad podría deberse a una reducción en el tamaño de los tilacoides, donde la luteína se localiza y sintetiza predominantemente (Solovchenko *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2014).

Comercialmente los procesos de extracción y purificación de luteína son principalmente los que determinan la calidad y el costo de esta, debido a que este pigmento está presente en los cloroplastos de las microalgas es necesario realizar un proceso de separación seguido de una purificación, esto obviamente tomando en cuenta la aplicación final del pigmento. Además de que también, el método y los solventes utilizados en la extracción son quien determinarán la eficiencia y la calidad de la luteína, lo que se traduce en el aumento de precio de la luteína, por lo que no es raro encontrar métodos de extracción que combinen tanto el uso de solventes como métodos físicos de ruptura celular (Zheng *et al.*, 2022).

Debido a que los carotenoides son moléculas que presentan espectros de absorción muy característicos con patrones que pueden ser diferenciados entre moléculas se puede realizar una identificación con base en sus espectros de absorción, con longitudes de onda específicas (Gayathri *et al.*, 2017). La luteína presenta el pico de absorción más alto a una longitud de 446 nm, en el rango del espectro visible, filtrando la luz azul y protegiendo a los organismos fotosintéticos, a la vez que permite el paso de otras longitudes de onda que son claves en la fotosíntesis (Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

Con el fin de corroborar la identidad de los picos en los cromatogramas después del análisis UHPLC (**figura 5.10**) y con base en lo mencionado anteriormente, los espectros de absorción de cada pico fueron analizados, los cuales se muestran en la **figura 5.11**.

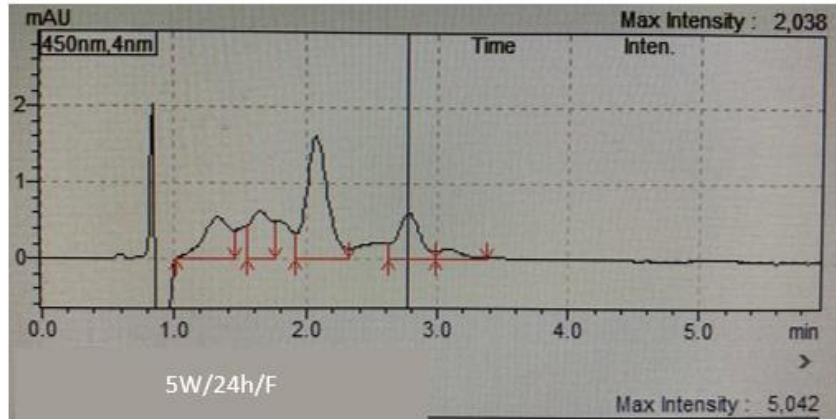


Figura 5.10. Cromatograma correspondiente al tratamiento de 5 watts, fotoperiodos de 24 h y luz fría.

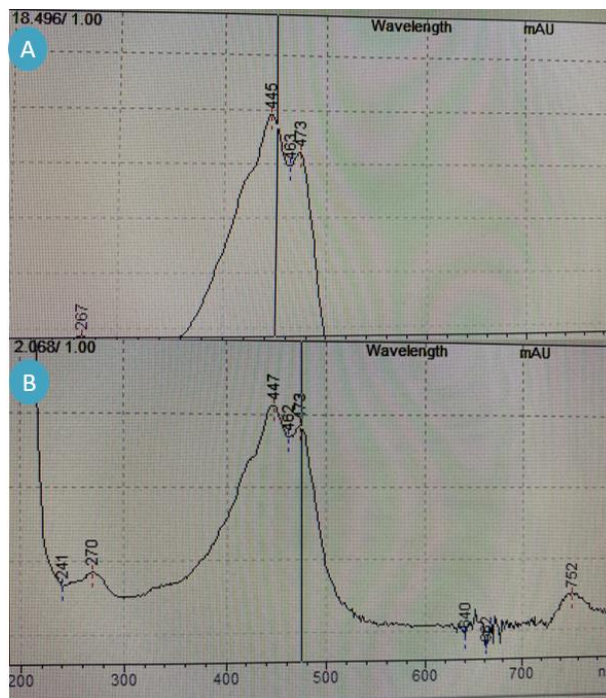


Figura 5.11. Comparación de espectros de absorción de pigmentos: A) corresponde al estándar de luteína los picos se detectaron a 445 y 473 nm. B) Tratamiento 15 W, fotoperiodos de 12 h y luz fría, los picos fueron detectados a una longitud de onda de 447.

5.2.4 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) tanto para la biomasa (**Anexo 1**) como para la generación de luteína (**Anexo 2**). De acuerdo con los resultados del ANOVA correspondiente a la biomasa, se concluyó con un 95% de confianza que tanto la intensidad, así como la

interacción entre fotoperiodos y color son estadísticamente significativos, por lo que cambios en este factor e interacciones están asociados con el incremento de la biomasa. Esto se corrobora con el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (**Anexo 1**), en el cual claramente se puede observar que el efecto más notable está dado por la intensidad lumínica. De Igual forma, las gráficas de residuos (**Anexo 1**) correspondientes a la concentración de biomasa fueron analizadas. En el caso de la gráfica de residuos contra ajustes, la distribución de los puntos es aleatoria a ambos lados del cero y no presentan un patrón detectable, lo cual indica que se presenta una varianza constante. En el caso de la gráfica de residuos contra el orden, se puede verificar el supuesto de que los residuos son independientes entre sí, ya que no se percibe una tendencia o patrones cuando los residuos son dispuestos en orden cronológico. También, se comprueba el supuesto de normalidad, ya que los residuos están distribuidos normalmente sobre la línea recta de referencia.

Para el análisis de varianza relacionado con la acumulación de luteína (**Anexo 2**), se puede concluir con un 95% de confianza que las medias de los parámetros, como de las interacciones son iguales, por lo que no existe diferencia significativa. Esto puede ser comprobado con el diagrama de Pareto, en el cual ninguno de los parámetros o de sus interacciones atraviesan la línea de referencia. Las gráficas de residuos para la acumulación de luteína fueron igualmente analizadas. En la gráfica de residuos contra ajustes la distribución de los puntos es aleatoria a ambos lados del cero con un patrón irregular, y no presentan un patrón detectable, sin embargo, existen puntos alejados del cero lo cual indica que son valores atípicos y muestran que la varianza no es constante. En el caso de la gráfica de residuos contra el orden se puede comprobar el supuesto de que los residuos son independientes entre sí, ya que no se muestra una tendencia o patrones cuando se muestran en orden cronológico. En la gráfica de probabilidad normal se puede apreciar que los datos no siguen una distribución normal, al no distribuirse uniformemente sobre la línea de referencia, y de igual forma se presentan valores atípicos.

Considerando esto último, se realizó una prueba de Kruskal Wallis (**Anexo 3**), debido a que el valor de $p(0.744) > \alpha(0.05)$, grupos= 8, n=3. Con esta prueba se concluyó que bajo estas condiciones, no se cuenta por el momento con suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, ya que las medianas de la población no presentaron diferencias

significativas, sin embargo, éstas no pueden ser descartadas totalmente, debido a que existe un 25% de probabilidad que las medianas sean diferentes.

Por lo que, de acuerdo con los análisis estadísticos, se concluyó que la intensidad de iluminación es el factor de mayor peso, relacionado con la generación de biomasa del consorcio BR-UANL-01, sin embargo, en cuestiones de generación de luteína estos factores no pueden ser descartados, debido a que como se mencionó anteriormente, existe probabilidad de que influyan en la acumulación de luteína, de acuerdo con el resultado de la prueba no paramétrica.

De acuerdo con autores como Barsanti y Gualtieri, (2018) y Liang, Zhu y Jiang (2018), el uso de microalgas con fines comerciales, en muchos casos involucra dos etapas: la primera está relacionada con el cultivo y aumento de biomasa, en donde las células crecen en condiciones ricas en nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-}) para maximizar la producción de biomasa y una segunda etapa donde son generadas condiciones de estrés que inducen a la acumulación del o los bioproductos deseados. Esto debido a que pequeñas modificaciones en las condiciones de cultivo (pH, salinidad, temperatura, nutrientes, luz, etc.) pueden desencadenar la síntesis o acumulación de productos de alto valor comercial, como la luteína. De acuerdo con Minhas *et al.*, (2016), la adopción de esta estrategia puede incrementar la producción total de los metabolitos generados durante el incremento de la biomasa.

En investigaciones como la realizada por Chen *et al.*, 2018, con el objetivo de incrementar la producción de luteína, fue utilizado un cultivo heterotrófico en dos etapas, para una cepa mutante de *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 con las que obtuvieron una alta concentración de luteína 3.67 mg/g en un cultivo batch tras un periodo de 7 a 8 días. Por otro lado, Xie *et al.*, 2020, desarrollaron una estrategia de cultivo de dos fases, en la cual, en un primer paso cultivaron la cepa de *Chlorella sorokiniana* FZU60 en condiciones mixotróficas en un reactor de lote alimentado para incrementar la concentración de biomasa. Posteriormente, en un segundo paso fueron modificadas las condiciones utilizando un cultivo foto-autotrófico para promover la síntesis de luteína, con lo cual alcanzaron una producción de 9.51 mg/g. Por su parte Zhao *et al.*, 2019, desarrollaron una metodología para el incremento de la producción de biomasa y acumulación de luteína de la cepa *Chlamydomonas* sp. JSC4 en la cual en una primera etapa utilizaron un fotobiorreactor de lote alimentado con luz blanca manteniendo el

cultivo a temperatura constante de 35°C. En una segunda etapa modificaron las condiciones de iluminación utilizando luz color azul a una temperatura que oscilaba entre 20 a 25°C con lo cual llegaron a acumular hasta 4.24 mg/g.

Considerando la evidencia tanto estadística como científica, se optó por realizar un cultivo en dos fases para la generación de luteína. En la primera fase se realizó el escalamiento de los fotobiorreactores y el aumento de la biomasa utilizando las condiciones del tratamiento correspondiente a 5/12/F, continuando con una segunda fase en la cual se generó el estrés celular, donde se modificaron algunos parámetros en los reactores, como es descrito en el punto 4.10.

5.3 Escalamiento

5.3.1 Construcción de fotobiorreactores

Este tipo de diseño se ha probado en pequeña escala como en la investigación realizada por Molino *et al.*, 2020, en dónde se utilizó un reactor del tipo columna de burbujeo para la generación de luteína con microalgas de la especie *Scenedesmus almeriensis*, donde fue utilizado acrílico transparente para la columna del fotobiorreactor, con un volumen de trabajo de 1.25 L al cual fue inyectado una mezcla de CO₂/N₂/O₂ con luz blanca acoplada que proporcionó iluminación de 4000 lx. En la investigación realizada por McClure *et al.*, 2019, fue construido un reactor de columna de burbujeo para la generación de luteína utilizando microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* con un volumen de trabajo de 5 L para la columna expuesta a la luz, se utilizó acrílico transparente como en esta investigación. La iluminación constó de luces LED de 6000 K, proporcionando una intensidad de 440 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, inyectando aire con un flujo de 5 L/ min y CO₂, con un flujo de 50 mL /min. Así como en escalas mayores, como tal es el caso de Xie *et al.*, 2020 quienes, con el objetivo de promover la síntesis de luteína, trabajaron con microalgas de la especie *Chlorella sorokiniana* y polimetilmetacrilato transparente para construir la columna del fotobiorreactor a diferencia de Molino *et al.*, el volumen de trabajo del fotobiorreactor fue de 50 L, al cual se le inyectó aire con 2.5% de CO₂, siendo iluminado con luces LED que brindaban 350 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

5.3.2 Monitoreo de los parámetros durante el escalado e inducción de estrés

Al igual que en las etapas previas, durante el escalado de los fotobiorreactores se analizaron los parámetros, tanto de pH como de la conductividad eléctrica. Los resultados pueden observarse en las **figuras 5.12** y **5.13** respectivamente.

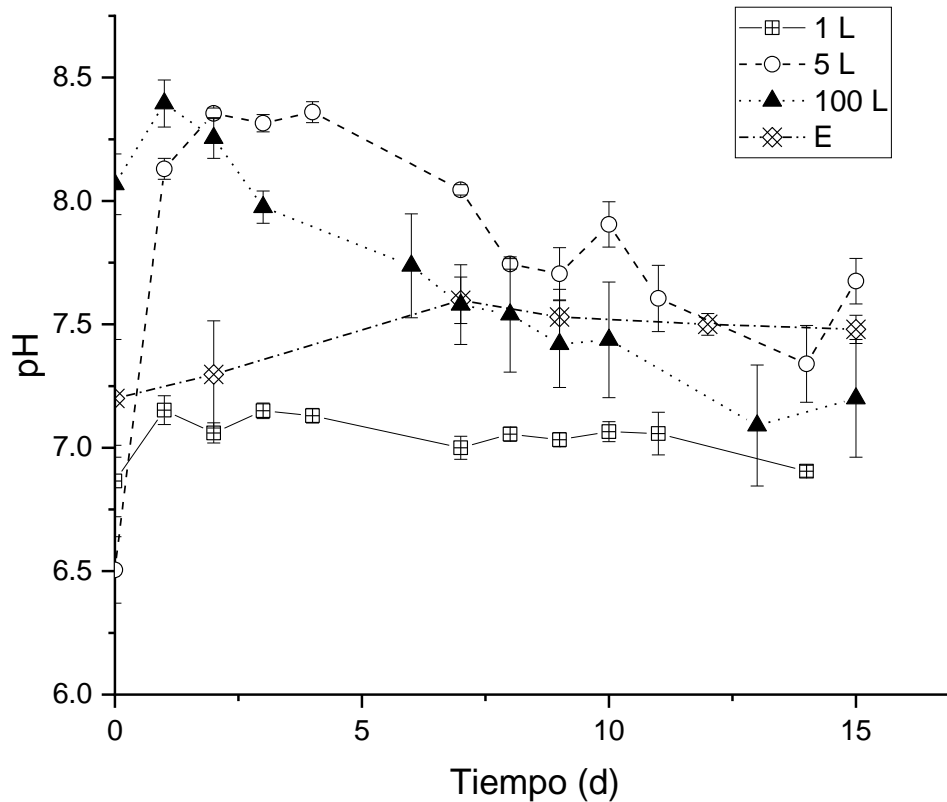


Figura 5.12. Valores de pH durante la fase de escalado (1 L, 5 L y 100 L) e inducción de estrés (E), ($n = 3$) \pm EE.

En la **figura 5.12**, se puede apreciar que en todas las fases del escalamiento se registró el incremento del pH al primer día de operación. En el caso de los fotobiorreactores de 1 L los valores de pH tuvieron poca variación durante esta fase, oscilando entre 7.05 y 7.15, en la segunda etapa del escalamiento los fotobiorreactores de 5 L, registraron un marcado incremento en este parámetro el primer día de operación, obteniendo un valor de pH de 8.13, manteniendo este incremento gradual hasta el día 4 de operación, donde se registró el valor más alto, con 8.36, presentando un posterior descenso, mostrando variaciones entre 7.34 y 7.90, hasta el final de esta fase. Por último, en la fase final del escalado con los fotobiorreactores de 100 L, se observó el mismo patrón que en la fase anterior, registrando

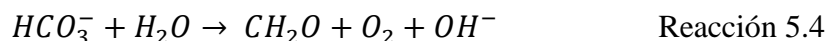
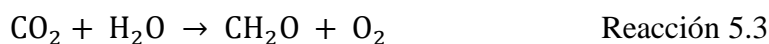
un incremento el primer día de operación obteniendo 8.40. A partir del día 4 se presentó un descenso continuo hasta llegar a un valor de 7.20. En cuanto a la etapa de inducción de estrés, el incremento de pH se presentó hasta el día 7 de operación registrando 7.60, posteriormente este valor se mantuvo casi constante oscilando entre 7.53 y 7.50, hasta finalizar con 7.48 al término de dicha etapa.

Los valores reportados de pH obtenidos durante esta investigación son mucho menores que lo reportado por Mennaa, Arbib y Perales (2019), quienes en un reactor de columna de burbujeo de 19 L inocularon un consorcio de microalgas y cianobacterias, alcanzando valores de hasta 12.7. Por otro lado en la investigación realizada por McClure *et al.*, (2019), se utilizaron reactores de columna de burbujeo de 50 L, con dos volúmenes de aireación 0.2 VVM y 1 VVM, para la producción de luteína con *C. vulgaris*, en el suministro de 0.2 VVM de aire se registraron valores alcalinos, llegando hasta 11.6 y en el caso de 1 VVM se mantuvo entre 8 y 9.5 valores cercanos a lo obtenido en la fase de escalamiento durante este proyecto, sobre esta variación los autores mencionan que puede deberse a la retención del aire el cual fue 4.5 veces mayor en el suministro de 1 VVM, propiciando el incremento del área entre las fases de gas-líquido para aumentar la transferencia de masa, es decir un incremento en la velocidad de suministro podría aumentar el coeficiente de transferencia de masa, por lo que tasas de flujo de gas altas mejoran la transferencia de masa, resultando en valores de pH próximos a la neutralidad.

Sin embargo, Dasan *et al.*, (2020), con el objetivo de entender los efectos que el pH tiene en la obtención de biomasa, inocularon *C. vulgaris* en diferentes intervalos de pH. De acuerdo con sus resultados, esta cepa de microalgas es afín a los medios ácidos, ya que fue en pH 3 donde se obtuvo una mayor concentración de biomasa y en pH 9 donde hubo un aumento muy pobre de la concentración de biomasa, concluyendo que, al menos *C. vulgaris* prefiere el ácido carbónico (H_2CO_3) sobre el bicarbonato (HCO_3^-) o carbonato (CO_3^{2-}) como fuente de carbono.

De acuerdo con Erbland *et al.*, (2020), la mayoría de las microalgas requieren un pH entre 7 – 9, siendo 8.2 - 8.7 el considerado como óptimo. Como se ha mencionado anteriormente, el crecimiento fotosintético tradicionalmente se ha reportado como un proceso de alcalinización por el simple consumo de carbono inorgánico (bicarbonato (HCO_3^-) o carbonato (CO_3^{2-})) que

libera compuestos básicos como se puede observar en las reacciones 5.3 y 5.4 (Xue *et al.*, 2021).



Lo cual predomina en un intervalo de pH de entre 6.36 a 10.33, favoreciendo la producción de biomasa (Beltrán-Rocha *et al.*, 2021) exceptuando algunos los casos en donde las cepas prefieren otras fuentes de carbono.

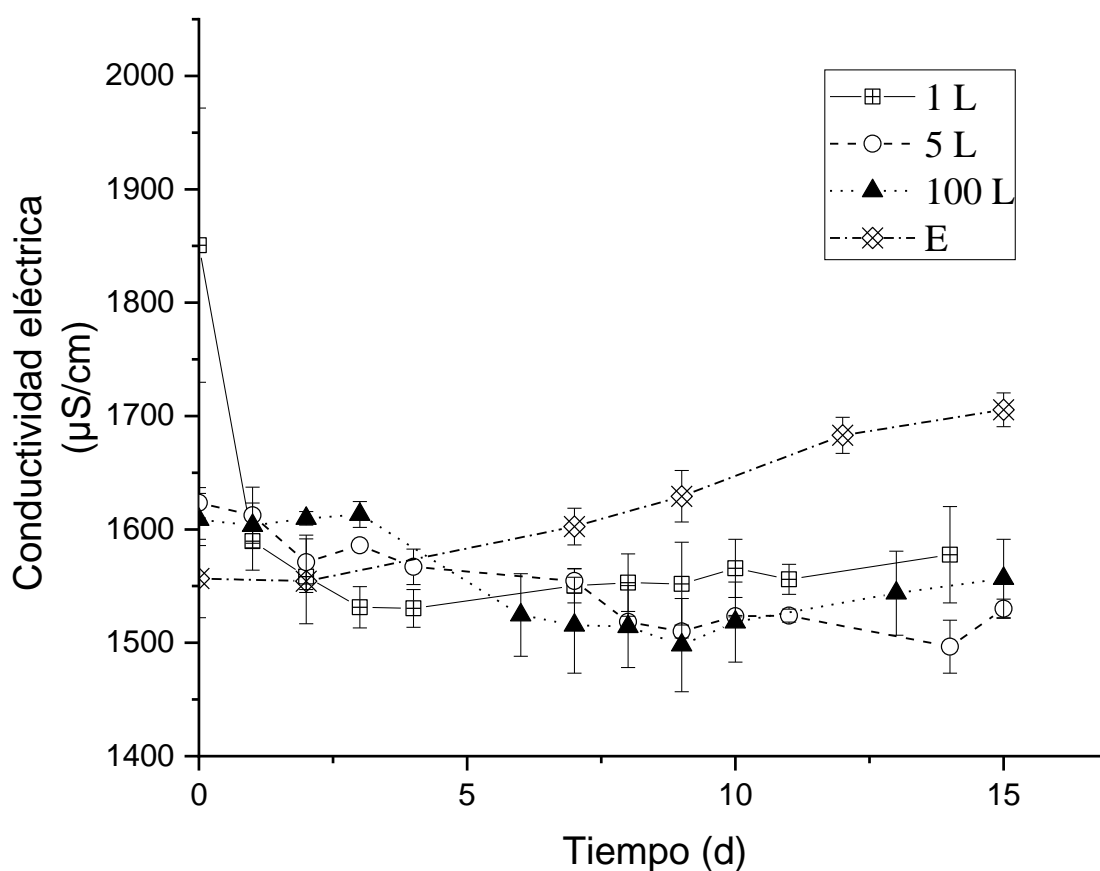


Figura 5.13. Valores de conductividad eléctrica durante la fase de escalado (1 L, 5 L y 100 L) e inducción de estrés (E). Promedio (n = 3) ± EE.

En la **figura 5.13** se observa el comportamiento de la conductividad eléctrica en las diferentes fases de la etapa de escalamiento e inducción de estrés. Se enfatiza la disminución de la conductividad eléctrica al segundo día de operación en cada fase del escalamiento y tanto en los fotobiorreactores de 1 L y 5 L continuaron con el descenso al segundo día, registrando valores de 1558.33 y 1571 μS/cm. En el caso de los fotobiorreactores de 100 L, se observó

un incremento a partir del segundo día, alcanzando 1609.75 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y es hasta el día 4 de operación en el que se aprecia el descenso registrando, 1524.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y es a partir del día 7 que tanto los fotobiorreactores de 5 L como 100 L tienen un comportamiento similar hasta el día 15 de operación, obteniendo 1530 y 1556.75 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente. Por otro lado, la etapa de inducción de estrés mantuvo constante la conductividad eléctrica desde el inicio hasta el segundo día de operación, con de 1555 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y es a partir del día 7 que se registró un incremento en la conductividad eléctrica, llegando hasta 1705.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ al final de esta etapa.

En el estudio realizado por Sharma *et al.*, (2020), utilizaron una cepa de *C. minutissima* para la ficorremediación de un efluente de agua residual. El descenso de la conductividad eléctrica registrado tuvo un comportamiento similar al que se registró en esta investigación, comenzando el segundo día de operación y continuando hasta el día 25, pasando de 3500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 250 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Arashiro *et al.*, (2020)., por su parte reportan un descenso de 470 ± 310 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en promedio entre sus cultivos con diferentes porcentajes de agua residual, para la generación de ficobiliproteína. Una posible razón para este resultado puede deberse a que dichas mezclas se realizaron con medio BG-11, el cual contiene una variedad de sales para el crecimiento de las cianobacterias, dichas sales pudieron sumarse a la mezcla de nutrientes propia de las aguas residuales, por lo cual el resultado desembocó en una menor disminución de la conductividad eléctrica. Similar a lo anterior Colusse *et al.*, (2020), analizaron el comportamiento bioquímico de *Dunaliella salina* en tres medios diferentes F/2, Conway y Jhonson a nivel laboratorio, con el objetivo de obtener la mejor opción costo/beneficio para la obtención de pigmentos como, obteniendo 10, 9.4 y 6 % respectivamente, en un lapso de 15 días. Estos resultados se relacionan directamente con la disposición y el consumo de nutrientes por *D. salina*, durante cada uno de los medios de cultivo y el crecimiento de la biomasa.

De acuerdo con Beltrán-Rocha *et al.*, (2021), el descenso en los valores de conductividad eléctrica puede deberse a la asimilación de nutrientes por la biomasa y a la precipitación de algunos compuestos iónicos, como: NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ así como algunos elementos traza, ya que la conductividad eléctrica se ve alterada de acuerdo con el número de iones presentes en el medio (Khan *et al.*, 2019).

Respecto a la prueba de porcentaje de floculación, el consorcio BR-UANL-01 conservó la capacidad de floculación, durante todas las fases del escalamiento, obteniendo valores promedio de 98% para los reactores de 1 L, 90% para los de 5 L y 70% para 100 L, cayendo dentro de los valores reportados con floculantes inorgánicos para la cosecha de microalgas, los cuales van desde el 60% al 100% de floculación (Beltrán-Rocha, 2017); sin embargo, en la etapa de inducción de estrés la floculación disminuyó hasta un 53%, de acuerdo con Dasan *et al.*, (2020). En condiciones altamente alcalinas la biomasa forma precipitados con carga positiva induciendo la floculación de esta al neutralizar la superficie de la biomasa de carga negativa. Mennaa, Arbib y Perales, (2019), mencionan que en medios con bajas concentraciones de fosfato, la floculación puede ser inducida por la precipitación de hidróxido de magnesio $Mg(OH)_2$, por lo que esto podría ser un área de oportunidad para en futuras investigaciones monitorear tanto la concentración de fosfato como la de hidróxido de magnesio.

5.3.3 Determinación de iones de nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}) en escalamiento

Los resultados de la remoción de nutrientes contaminantes en los efluentes secundarios utilizados en el escalamiento pueden observarse en la **figura 5.14**, y en la **tabla 5.3**, se describen tanto la concentración, el porcentaje de remoción, el rendimiento y la tasa de remoción durante las etapas de escalado e inducción de estrés, se tomó la concentración inicial, constante para hacer los cálculos de remoción, ya que siempre se utilizó el mismo lote de agua residual tratada.

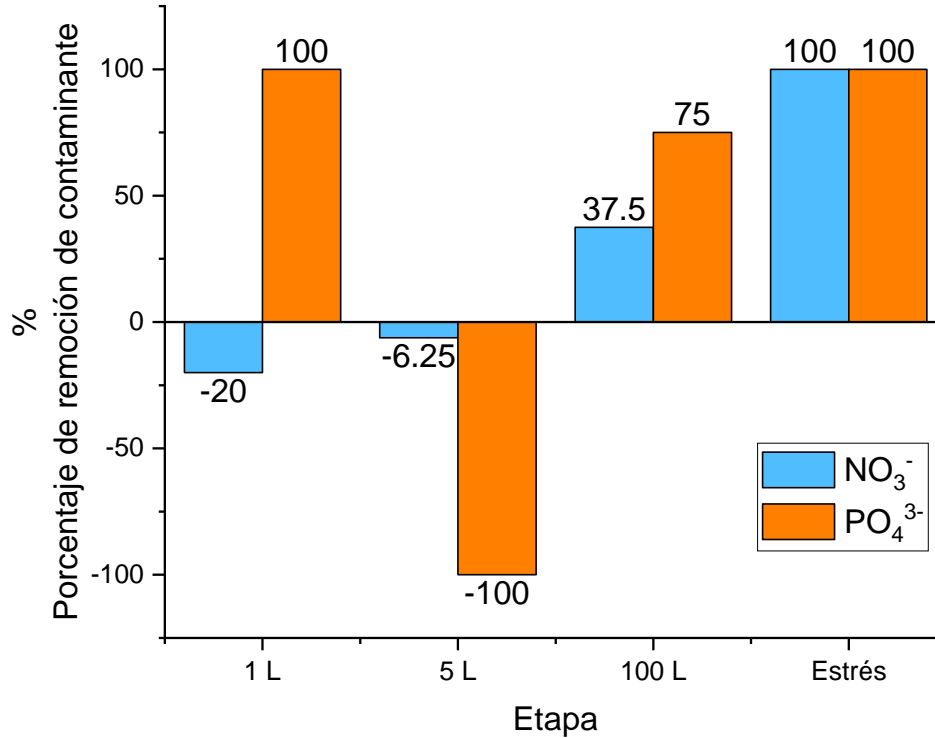


Figura 5.14. Porcentajes de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} , en cada etapa del escalamiento y en la fase de inducción de estrés. Promedio ($n = 3$) \pm EE.

Tabla 5.3 Concentración, porcentaje de remoción, rendimiento y tasa de remoción de contaminantes en el escalamiento e inducción de estrés.

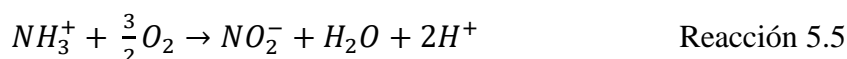
Fase	Concentración (mg s/L)	% remoción	Rendimiento (mg s/ mg DCW)	Tasa de remoción (mg s /L/d)
NO_3^-				
Inicial	80 \pm 0			
1L	96.25 \pm 7.5	-20.31 \pm 9.38	-0.045 \pm 0.04	-1.16 \pm 0.54
5 L	83.75 \pm 2.5	-6.25 \pm 3.13	-0.027 \pm 0.02	0.89 \pm 0.36
100 L	65 \pm 19.15	37.5 \pm 0.00	0.167 \pm 0.09	1.34 \pm 1.35
Estrés	N.D. \pm 0	100 \pm 0.00	0.06 \pm 0.02	4.33 \pm 1.28
PO_4^{3-}				
Inicial	0.250 \pm 0.0			
1L	N.D. \pm 0.0	100 \pm 0.0	0.0009 \pm 0.0	0.018 \pm 0.0
5 L	0.500 \pm 0.0	-100 \pm 0.0	0.0014 \pm 0.0	-0.036 \pm 0.0
100 L	0.063 \pm 0.12	75 \pm 0.0	0.0022 \pm 0.0	0.031 \pm 0.0
Estrés	N.D. \pm 0.0	100 \pm 0.0	7.494E-05 \pm 0.0	0.004 \pm 0.0

N.D. No Detectado. Promedio: ($n = 3$) \pm EE

Durante la etapa de reactores de 1 L se incrementó la concentración de NO_3^- así como en la etapa de 5 L se registró la adición tanto de NO_3^- como PO_4^{3-} ; sin embargo, en la última etapa de escalado, como en la etapa de inducción de estrés, esta adición es consumida, registrando un 37.5 y 75 % de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} respectivamente en la etapa de 100 L, hasta lograr una completa remoción en la fase de inducción de estrés. Al ser el rendimiento una medida que relaciona el consumo de nutrientes y la biomasa, al existir aportes éste se vuelve negativo, lo que se puede observar con los -0.045 y -0.027 mg s/ mg DCW en los reactores de 1 y 5 L para NO_3^- . Excepto cuando estos aportes son mínimos, el signo no varía, lo cual puede observarse con 0.0014 mg s/mg DCW para PO_4^{3-} . El valor de -1.16 mg s/L/d registrado en la tasa de remoción de NO_3^- es interpretado como la cantidad de sustrato que es aportado por la biomasa durante la etapa de 1 L. Esto cambia en los reactores de 5 L, registrando 0.89 mg s/L/d, debido a que se lleva a cabo un consumo del nutriente. Posteriormente, este comportamiento incrementa en el reactor de 100 L y en la etapa de inducción de estrés. Para el aprovechamiento del PO_4^{3-} se presenta un comportamiento similar, dónde se registró un valor de -0.036 mg s/L/d en el reactor de 5 L lo que indica el aporte del nutriente, el cual es consumido en la fase posterior y en la etapa de inducción de estrés logrando una tasa de remoción de PO_4^{3-} de 0.031 y 0.004 mg s/L/d respectivamente.

Estos resultados son superiores a lo reportado por Chaudhary, Tong y Dikshit, (2020), quienes lograron remover 60% del NO_3^- y 82% de PO_4^{3-} al tratar agua residual con una cepa de *C. vulgaris*, en un reactor de columna de burbujeo al cual fue suministrado con aire atmosférico. Se registró una remoción de NO_3^- mayor a lo reportado por Mennaa, Arbib y Perales, (2019), quienes en un reactor de columna de burbujeo de 19 L inocularon un consorcio de microalgas y cianobacterias, logrando remover el 88% del nitrógeno total y la totalidad del PO_4^{3-} del efluente secundario. Se obtuvo también una mayor remoción de NO_3^- respecto a lo reportado en la investigación de Molino *et al.*, (2019), quienes obtuvieron una remoción de 87.2 % con una inyección de CO_2 del 3% y en el caso del PO_4^{3-} , también se registró el 100% de remoción, esto en un fotobiorreactor de 30 L, donde se analizó la capacidad de *Scenedesmus almeriensis* como microalga de captura del CO_2 . Por otra parte en la investigación realizada por Magalhães *et al.* (2022), se menciona el aporte del 8.3% de los nitratos y la asimilación del 100% del fósforo presente en agua residual de la industria cárnica, con un consorcio de microalgas. El aporte de nitratos, de acuerdo con los autores, se

debe a que la principal ruta para la remoción de nitrógeno es a través de la nitrificación ya que la asimilación del NH_4 representa un menor gasto energético (reacciones 5.5 y 5.6), para la asimilación de este nutriente por la biomasa, y esta aumenta con la combinación de largos periodos de cultivo y la adición de CO_2 . Una vez que el NH_4 atraviesa la membrana es directamente incorporado a los cloroplastos para finalmente formar aminoácidos necesarios para el crecimiento y replicación celular. Por otra parte, tanto el NO_3^- y el NO_2^- deben ser reducidos a NH_4^+ con ayuda de enzimas como es mencionado en el punto 5.2.2, esta reducción de nutrientes se lleva a cabo en la membrana plasmática (Chai *et al.*, 2021; Fallahi *et al.*, 2021; Mohsenpour *et al.*, 2021). Es importante mencionar, que tanto la disociación de la materia orgánica, como la muerte celular en el consorcio, también generan aportes tanto nitrógeno como fósforo orgánico, los cuales podrían generar un aumento en estos parámetros, ya que de acuerdo con algunos autores como: Mondal *et al.*, 2022, Corell, 1998 y Seale *et al.*, 1987 coinciden en que la asimilación de algunos nutrientes se ve afectada por las condiciones ambientales del medio de cultivo, entre ellas, el incremento de pH, salinidad/fuerza iónica del medio de cultivo (Conductividad Eléctrica) y el flujo de fotones, lo cual se podría vincular con las fases de escalamiento y los periodos de adaptación de las células a las nuevas condiciones.



Como es bien sabido, las microalgas en sistema de tratamiento de aguas residuales son capaces de metabolizar nutrientes como el NO_3^- y PO_4^{3-} , transformándolos en nuevas moléculas que sirven en la formación de nuevas células, como es el caso del proteínas y adenosín trifosfato (ATP) o adenosín difosfato (ADP), fosfolípidos, así como el material genético en las células (Abinandan *et al.*, 2015). Sin embargo, la luteína, al ser un metabolito primario, su biosíntesis está asociada con el crecimiento celular, por lo que la disponibilidad de nitrógeno puede afectar indirectamente la acumulación de luteína en microalgas. No obstante, el nitrógeno sí es requerido para la formación de proteínas que forman parte tanto del complejo antena como de la “maquinaria fotosintética” (Zheng *et al.*, 2022). De acuerdo con Juneja, Ceballos y Murthy (2013), una baja disponibilidad de nitrógeno en el medio de

crecimiento crea un desequilibrio enzimático, donde las células reducen la síntesis de clorofila, incrementando la carotenogénesis. Esto es principalmente por la regulación de la sobreexpresión de las enzimas PSY, PDS, LCY-B, CHY-B y BKT al incrementar la síntesis de carotenoides (Sun *et al.*, 2018). Por lo que las condiciones extremas de nitrógeno, es decir, déficit o no limitado, desencadenan la síntesis de luteína, no obstante, el agotamiento paulatino de este nutriente conduce a la célula a aprovechar la luteína existente para funciones metabólicas, provocando una reducción drástica en la concentración de la luteína (Zheng *et al.*, 2022).

El fósforo como fue mencionado anteriormente es un elemento de gran importancia, ya que está involucrado en la replicación, en moléculas energéticas y como parte de las moléculas precursoras en la carotenogénesis, en microalgas el cual sólo es aprovechado cuando se encuentra en la forma de ortofosfato (PO_4^{3-}). Al no estar este presente en el medio, las células transforman el fósforo existente con la ayuda de la enzima fosfatasa que está presente en la superficie celular (Kumar *et al.*, 2022). Como es bien sabido, las aguas residuales son una gran fuente de PO_4^{3-} , por lo que cuando las microalgas/cianobacterias se encuentran en medios ricos en fósforo, ocurre un fenómeno conocido como “luxury uptake” donde la célula almacena gránulos de polifosfatos insolubles dentro de ella (Solovchenko *et al.*, 2019). Y por el contrario, si las microalgas se encuentran en un medio con alta concentración de PO_4^{3-} se puede llevar a la inhibición del crecimiento, o a la llamada intoxicación por fósforo (Liyanarachchi *et al.*, 2020).

5.3.4 Acumulación de luteína e incremento de biomasa

De acuerdo con el protocolo de escalamiento y producción de luteína descrito en el punto 4.10, tras las fases de escalado y después de la fase de estrés se detuvo la operación del fotobiorreactor escala piloto, para posteriormente recuperar la biomasa. Cabe mencionar que se realizaron extracciones de pigmentos por el método descrito en el punto 4.7, tras cada aumento de volumen y al final de la etapa de escalado y estrés.

En la **Figura 5.15**, se observa la cinética de crecimiento del consorcio de microalgas floculantes BR-UANL-01, el cual se ajustó con un 99.75% a un modelo logístico modificado, en el cual se observa la duración de la fase de latencia que va del día cero al día tres, a partir de este último y hasta el día 21, es la fase exponencial y a partir del día 21 hasta el día 30 se

registra la fase estacionaria. Igualmente se aprecia la concentración de luteína generada durante el crecimiento del consorcio, registrando una concentración de 0.11 mg/g al inicio de la etapa de escalado, 0.06 mg/g al término de esta y obteniendo al final de la etapa de inducción de estrés 0.25 mg/g, correspondiente a un total de 59.43 mg de luteína.

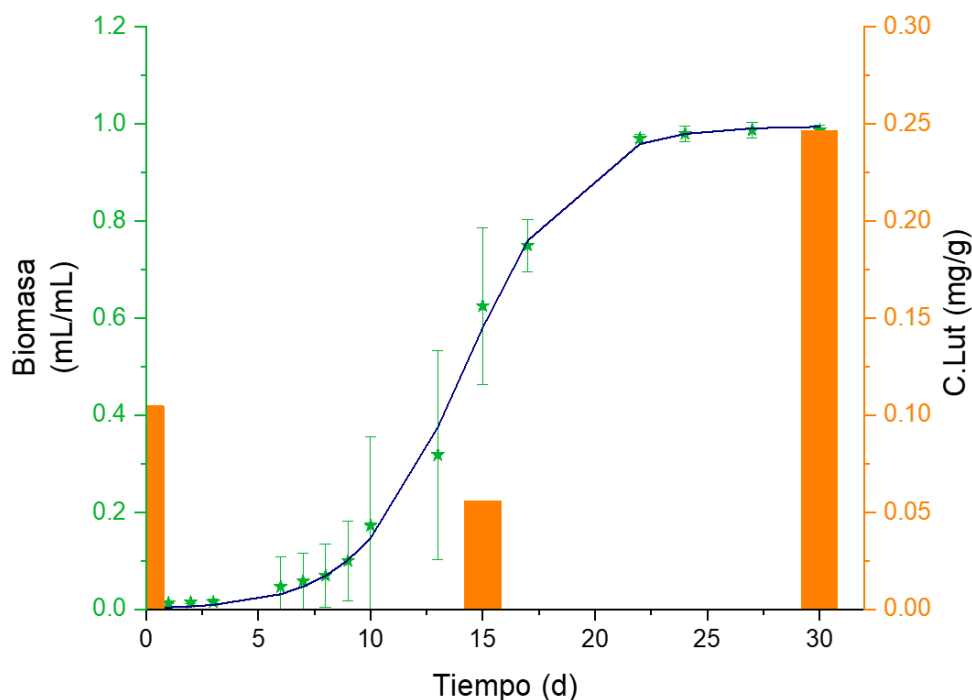


Figura 5.15. Cinética de crecimiento del modelo logístico modificado (línea continua), relación RBM (estrellas verdes) y concentración de luteína en las células (barras naranjas). Promedio ($n = 3$) \pm EE.

Como se ha mencionado durante esta investigación, la luz es uno de los parámetros principales en el cultivo de microalgas. Debido a que éstas utilizan la luz para llevar a cabo reacciones que convierte los fotones en energía química a partir de enlaces moleculares en dónde secuestran el carbón del CO_2 dentro de sus células para funciones de replicación y crecimiento. Por lo que la intensidad lumínica también es un factor determinante en el crecimiento de las microalgas. Cuando la tasa máxima de fotosíntesis es alcanzada, el exceso de luz (fotones) continúa siendo absorbido por la célula y esto conduce a un estado de saturación lumínica de la fotosíntesis. Que a su vez, produce una reducción en la tasa de fotosíntesis o una fotosíntesis ineficiente (Maltsev *et al.*, 2021). Por lo tanto, si intensidad de iluminación se encuentra por debajo del punto de saturación, las células no tendrán la suficiente energía para llevar a cabo sus funciones metabólicas, inhibiendo el crecimiento, caso contrario si la intensidad es muy alta, podría provocar la fotoinhibición de la célula,

debido al incremento de la cantidad de energía dentro ella, ya que ésta no es capaz de dispersarla de forma eficiente, generando daños irreversibles en los fotosistemas (Bahman *et al.*, 2022).

Para evitar el daño en organelos importantes como los fotosistemas, los organismos fotosintéticos presentan un método de defensa, el comúnmente llamado complejo antena o sistema antena, el cual está formado por proteínas unidas a pigmentos, quienes cumplen la función de transferir la energía captada de los fotones y desplazarlos a los fotosistemas dónde se realizan algunas funciones metabólicas, como la generación de la glucosa y moléculas energéticas como el ATP y ADP, a través de la fotosíntesis, la fotofosforilación y el ciclo de Calvin-Benson. Por lo que, para evitar los daños irreversibles que la sobreexposición a altas intensidades de luz provoca, los organismos responden generando pigmentos y proteínas que actúan como fotoprotección contra esta exposición, en respuesta al estrés se genera un cambio en la composición de los fotosistemas y en la proporción de los componentes encargados de la recolecta de fotones es decir cambios en la acumulación de algunos compuestos de importancia para la célula como proteínas, ácidos grasos y carbohidratos (Lokstein *et al.*, 2021; Maltsev *et al.*, 2021).

La luteína es una biomolécula con funciones primarias como la participación en la fotosíntesis, además también está involucrada en la síntesis de fitohormonas y protege a los fotosistemas del daño fotooxidativo y el estrés por calor, ya que forma parte del complejo antena, actúa disipando el exceso de energía (Rosas-Saavedra y Stange, 2016). Dicho estrés puede ser causado por el incremento en la temperatura, debido a que el aumento gradual hasta niveles “seguros” podría inducir al estrés fotooxidativo, en el cual se promueve la acumulación de luteína en las células cruzar este límite de temperatura pondría en riesgo la supervivencia y la replicación celular (Shi *et al.*, 2020). Por otro lado, también la limitación de macro y micronutrientes, se ha mencionado anteriormente la concentración y disponibilidad de nitrógeno y fosforo, ya que estos nutrientes intervienen en la producción de biomasa. Aunque no intervienen directamente en la síntesis de luteína, sí pueden interferir en la generación de proteínas y moléculas, involucradas en la síntesis de carotenoides en general (Menegol *et al.*, 2017). Por otro lado, el incrementos en la intensidad y calidad espectral de la iluminación, ya que estos factores determinan la eficiencia fotosintética y la acumulación de biomasa,

además de desencadenar la síntesis de carotenoides en las células (Carvalho *et al.*, 2011), por lo que, no inducir las células a estrés oxidativo evitaría el desencadenamiento de las reacciones que generan la acumulación de luteína (Zheng *et al.*, 2022; Bermejo *et al.*, 2018; Gong y Bassi, 2016).

Por otro lado, se registró un incremento de la contratación de biomasa, esto de acuerdo con los datos obtenidos durante cada aumento de volumen y durante la etapa de inducción de estrés, lo que se puede observar en la **Tabla 5.4** y en la **figura 5.16** se puede observar el incremento en la cantidad de biomasa total.

Tabla 5.4 Valores de biomasa obtenidos en cada fase del escalamiento e inducción de estrés.

Etapa de escalado	g (DCW) /L de biomasa	Producción de biomasa g (DCW)/L/d	Total de biomasa (g)	% de incremento respecto a la biomasa inicial	% de floculación por etapa
Inicial	1.438	-	1.448	-	100%
1 L	1.714	0.122	6.867	377.018	98%
5 L	1.350	0.096	18.900	1214.782	90%
100 L	1.544	0.110	154.375	10639.130	70%
Estrés	2.378	0.164	237.752	16439.304	53%

Promedio (n = 3) ± EE.

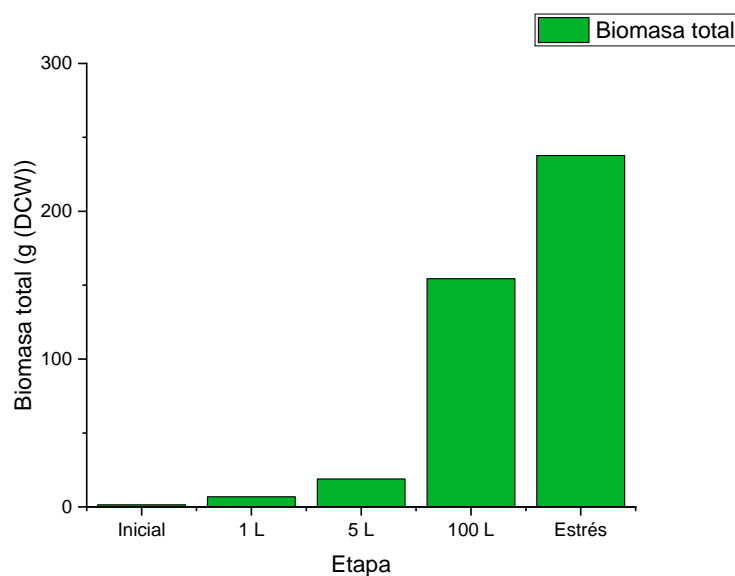


Figura 5.16. Acumulación de biomasa durante las etapas de escalamiento e inducción de estrés (n = 3) ± EE.

Al igual que en la producción de pigmentos, el crecimiento celular y la generación de biomasa están fuertemente ligados a la intensidad de iluminación, ya que a raíz de ella se regulan procesos biológicos de crecimiento y mantenimiento celular. De acuerdo con Metsoviti *et al.*, 2019, no solo la intensidad de luz es importante, sino la calidad de la misma, al jugar un papel importante en la tasa de crecimiento y la generación de biomasa, ya que por ejemplo en *C. vulgaris* al ser cultivada bajo intensidades continuas de 70 y 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes de 60 W con luz fría, se registró un crecimiento máximo en la intensidad de 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y por otro lado Khalili *et al.*, 2015 reporta la mejor producción con la misma alga en 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz cálida, por lo que también el incremento en la biomasa puede ser debido al buen mezclado del inóculo inicial junto con al aprovechamiento de los nutrientes disueltos en el medio durante la operación.

De acuerdo con Xie *et al.*, 2018, un buen mezclado en los cultivos de microalgas mejora la captación de luz debido a la disminución de los puntos oscuros causados por la superposición de la misma biomasa, esto también se puede explicar a través de la ley de Lambert-Beer. Deniz, 2020 menciona que una alta concentración celular utiliza más recursos para la síntesis, tanto de clorofila como de enzimas relacionadas con el crecimiento; es decir, cuando las células se exponen a concentraciones óptimas (sin restricción de nutrientes), hay una captura de fotones eficiente.

Por otro lado Wu y Merchuk, 2001, proponen que la tasa de crecimiento específico en la gran mayoría de las microalgas incrementa con el aumento del tiempo/periodos de iluminación con baja intensidad, alcanza valores constantes con una intensidad moderada y en alta intensidad, la tasa alcanzaba un máximo, sin embargo, disminuía, en consecuencia obviamente de la fotoinhibición de las células. Por lo cual, se puede inferir que debido a factores como un buen mezclado de la biomasa, una excelente captura de fotones, concentraciones de nutrientes óptimas así como iluminación adecuada, propiciaron el crecimiento de la biomasa en el consorcio de microalgas BR-UANL-01 durante esta investigación.

5.4 Perspectivas a futuro para el aprovechamiento de biomasa de microalgas.

Debido a problemáticas como el incremento poblacional, la extracción desmesurada de materias primas, la demanda de recursos para satisfacer las necesidades de la población y el

creciente calentamiento global (Kumar *et al.*, 2022; Ahmed *et al.*, 2022), es necesario un cambio en nuestros hábitos de consumo, por lo que procesos donde la materia prima extraída permanezca más tiempo en la cadena de producción son primordiales y diseñar procesos sostenibles que promuevan la economía circular (Kirchherr, Reike y Hekkert, 2017; Sharma *et al.*, 2022). En respuesta a lo anterior y como se ha demostrado a través de esta investigación, las microalgas son microorganismos que pueden ser una alternativa económicamente viable y sostenible para el tratamiento de las aguas residuales revalorizándolas (Kumar *et al.*, 2022) al obtener diversos bioproductos de interés comercial, esto más allá de los pigmentos, tal como: lípidos, ácidos grasos, hidrocarburos, proteínas, aminoácidos, azúcares, biotina, ácido fólico, minerales, mono y polisacáridos (Leu y Boussiba, 2014; Ambati *et al.*, 2019; Sosa-Hernández *et al.*, 2019; Alam *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022) sólo por mencionar algunos.

Inclusive la biomasa de microalgas es utilizada actualmente a nivel industrial para la generación de productos específicos o de nicho, como la utilización de células completas para enriquecer alimentos y bebidas, utilizar los extractos como agentes saludables para suplementos alimenticios (Abu-ghosh *et al.*, 2021) o debido a su gran contenido de micro y macronutrientes (N, P y C) y fitohormonas, necesarias para el crecimiento y desarrollo de cultivos. Por esta razón se ha promovido el uso de la biomasa en la agricultura como biofertilizantes naturales (Guo *et al.*, 2020). Siendo esta es una alternativa sostenible y de bajo costo a los fertilizantes sintéticos, existe evidencia de que estos biofertilizantes pueden incrementar la salud del suelo, reducir la incidencia de erosión, remover metales, recuperación de N en suelo, así como bioestimular la germinación de semillas en plantas (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017a; Khan *et al.*, 2019; Alam *et al.*, 2020; Abu-ghosh *et al.*, 2021; López-Pacheco *et al.*, 2021).

Por otro lado y como se ha expuesto a lo largo de esta investigación, debido a que estos microorganismos cuentan con diversas características que facilitan su cultivo, su gran capacidad de asimilación de nutrientes de aguas residuales, la utilización de diversas fuentes de carbono o inclusive recientemente la secuenciación completa del genoma de algunas especies como *Dunaliella salina*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* y *Phaeodactylum sp*, solo por mencionar algunas, esto junto con herramientas genómicas como CRISPR/Cas9, aumentan

el panorama de producción de compuestos de alto valor comercial “tradicionales” o gracias a la transformación de células explorar la opción de la generación de productos poco convencionales como: ubiquinona coenzima Q10, ubiquinol, cannabinoides, β -glucanos, sustancias antivirales, endotoxinas, bioestimulantes, sólo por mencionar algunos (Abu-ghosh *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- I. Se logró la remoción por encima del 80% de NO_3^- y un 100% de los PO_4^{3-} del efluente secundario utilizado como medio de cultivo en todos los tratamientos del DOE.
- II. La concentración de luteína registrada en los tratamientos del DOE osciló en un rango entre 10.52 a 21.21 mg/ g DCW y para el caso de la biomasa esta estuvo entre 3.26 a 4.8 g DCW/L en un periodo de 30 d
- III. Las condiciones lumínicas propuestas para promover la producción de luteína fueron no significativas para la acumulación de este pigmento en el consorcio BR-UANL-01, sin embargo, resultaron significativas para el aumento de la biomasa, siendo la intensidad y la interacción entre los fotoperiodos y el color, el factor y la interacción de factores que, de acuerdo con el ANOVA, influyen en su crecimiento.
- IV. Para la fase de escalamiento fue seleccionado el tratamiento correspondiente a 5 Watts, Fotoperiodos de 12 h L:O y luz fría debido a que fue el tratamiento que tuvo una mayor generación y productividad de biomasa en el DOE logrando la obtención de 4.8 ± 0.81 g DCW/L de biomasa con una productividad de 0.160 ± 0.027 g DCW/L/d, favoreciendo también la remoción de los nutrientes contaminantes, con un 99.9% de PO_4^{3-} y un 89.5% de NO_3^- .
- V. Durante la etapa de escalamiento se reportaron aportes de NO_3^- y PO_4^{3-} , esto también es comprobado con el rendimiento y la tasa de remoción de nutrientes en los reactores, donde se presentó este fenómeno, de acuerdo con diversos autores esto puede deberse a la muerte celular, proceso en dónde se liberan nutrientes al medio de cultivo como también a un cambio en la ruta para la metabolización del nitrógeno y en el caso del PO_4^{3-} , esto puede relacionarse con el fenómeno conocido como “luxury uptake”.
- VI. Durante la fase de inducción de estrés se obtuvo una completa remoción de los NO_3^- y PO_4^{3-} del efluente secundario utilizado como medio de cultivo, la generación total de 237.73 g DCW de biomasa y una acumulación de 59.43 mg de luteína total.

VII. La cinética de crecimiento del consorcio de microalgas BR-UANL-01, se ajustó con un 99.75% al modelo logístico modificado.

Recomendaciones

Con base en los resultados y en la revisión bibliográfica realizada en esta investigación, se proponen las siguientes recomendaciones, que deben ser tomadas en cuenta para futuros trabajos derivados de esta investigación, en primer lugar incluir el monitoreo de los niveles de Hidróxido de magnesio en el medio, con el objetivo de determinar si este compuesto influye en la floculación del consorcio de microalgas floculantes BR-UANL-01, también se recomienda explorar el uso de métodos de extracción de pigmentos y solventes distintos a los utilizados previamente, principalmente para determinar el rendimiento que se puede obtener a partir del consorcio de microalgas. Es importante hacer énfasis en explorar la generación de otros metabolitos de interés comercial como lo son: proteínas, ácidos grasos, hormonas de crecimiento para vegetales, carotenoides, astaxantina, ficocianina, ficoeritrina entre otros pigmentos, sólo por mencionar algunos. De igual manera se recomienda comprobar la capacidad del consorcio para fungir como agente biofertilizante, así como, realizar análisis del agua residual tras el crecimiento del consorcio con el objetivo de identificar la presencia de compuestos extracelulares, con el objetivo de promover y asegurar su uso en el riego agrícola, de igual forma, es recomendable analizar la capacidad del consorcio BR-UANL-01, para la asimilación, mineralización o bioacumulación de contaminantes emergentes, y por último y no menos importante se sugiere realizar un análisis de ciclo de vida para la biomasa y/o luteína sintetizada por el consorcio a partir de efluentes secundarios.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., y Iluz, D. (2021). Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 124895.
- Aghaie-Khouzani, M., Forootanfar, H., Moshfegh, M., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. (2012). Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 9-15.
- Alam, M. A., Xu, J. L., y Wang, Z. (Eds.). (2020). *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. Singapore: Springer.
- Altisent, R., Jaeger, S. R., Johnston, J. W., y Harker, F. R. (2013). Injection of flavor essences into fruit pieces: a new approach for exploring consumer preferences for novel flavors of apple fruit. *Journal of Sensory Studies*, 28(5), 405-413.
- Alves-Rodrigues, A., y Shao, A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology letters*, 150(1), 57-83.
- Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., y Yuepeng, S. (2019). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(12), 1880-1902.
- Amchova, P., Kotolova, H., y Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 73(3), 914-922.
- Amin, K. A., Hameid II, H. A., y Abd Elsttar, A. H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999.
- Anaya-Durand, A., y Pedroza-Flores, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 23(1), 31-39.
- Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., & Quevedo-Hidalgo, B. E. (2021). A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, 26(13), 3813.
- Andrade, D. S., Amaral, H. F., Gavilanes, F. Z., Morioka, L. R. I., Nassar, J. M., de Melo, J. M., ... y Telles, T. S. (2021). Microalgae: Cultivation, Biotechnological, Environmental, and Agricultural Applications. In *Advances in the Domain of Environmental Biotechnology* (pp. 635-701). Springer, Singapore.
- Arashiro, L. T., Boto-Ordóñez, Van Hulle, M., S. W.H, Ferrer, I. Garfí, M. y Rousseau, D. P.L. (2020) Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater, *Bioresource Technology*, Volume 303, 122894, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122894>
- Arathi, B. P., Sowmya, P. R. R., Vijay, K., Baskaran, V., y Lakshminarayana, R. (2015). Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects—A review. *Trends in Food Science y Technology*, 45(1), 105-117.
- Araujo, G. S., Matos, L. J., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., y Farias, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 95-98.
- Bahman, M., Aghanoori, M., Jalili, H., Bozorg, A., Danaee, S., Bidhendi, M. E., & Amrane, A. (2022). Effect of light intensity and wavelength on nitrogen and phosphate removal from municipal wastewater by microalgae under semi-batch cultivation. *Environmental Technology*, 43(9), 1352-1358.

Bellezza, S., Paradossi, G., De Philippis, R., y Albertano, P. (2003). *Leptolyngbya strains from Roman hypogea: cytochemical and physico-chemical characterisation of exopolysaccharides*. *Journal of Applied Phycology*, 15(2/3), 193–200. doi:10.1023/a:1023811311686

Beltrán-Rocha, J. C. (2014). *Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de Nuevo León, México Cultivadas en un nuevo fotobiorreactor* (Master dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Beltrán-Rocha, J. C. (2017). *Estudio del acondicionamiento y semi-purificación de microalgas nativas para la inducción de floculación, producción de biomasa y pulimento de efluentes municipales* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Beltrán-Rocha, J. C., Barceló-Quintal, I. D., García-Martínez, M., Osornio-Berthet, L., Saavedra-Villarreal, N., Villarreal-Chiu, J., y López-Chuken, U. J. (2017a). Polishing of municipal secondary effluent using native microalgae consortia. *Water Science and Technology*, 75(7), 1693-1701.

Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., y López-Chuken, U. J. (2017b). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427.

Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Rodríguez-Fuentes, H., Reyna-Martínez, G. R., Osornio-Berthet, L., García-Martínez, M., ... y López-Chuken, U. J. (2021). Some implications of natural increase of pH in microalgae cultivation and harvest by autoflocculation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(5).

Bermejo, E., Ruiz-Domínguez, M. C., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ramos-Merchante, A., Vega, J. M., ... y Garbayo, I. (2018). Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light. *Journal of bioscience and bioengineering*, 125(6), 669-675.

Biotech & Sostenibility. (2023). Biorreactores. <https://www.biotechsostenibility.com/fotobiorreactores-microalgas-laspalmas.html>

Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.

Borowitzka, M. A. (2013). *High-value products from microalgae—their development and commercialisation*. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756. doi:10.1007/s10811-013-9983-9

Brudzyńska, P., Sionkowska, A., y Grisel, M. (2021). Plant-Derived Colorants for Food, Cosmetic and Textile Industries: A Review. *Materials*, 14(13), 3484.

Cai, T., Park, S. Y., y Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., y Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 377-399.

Cavieres, L., Bazaes, J., Marticorena, P., Riveros, K., Medina, P., Sepúlveda, C., y Riquelme, C. (2021). Pilot-scale phycoremediation using *Muriellopsis* sp. for wastewater reclamation in the Atacama Desert: microalgae biomass production and pigment recovery. *Water Science and Technology*, 83(2), 331-343.

Cezare-Gomes, E. A., del Carmen Mejia-da-Silva, L., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Singh, A. K., y de Carvalho, J. C. M. (2019). Potential of microalgae carotenoids for industrial application. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(3), 602-634.

Chai, W. S., Chew, C. H., Munawaroh, H. S. H., Ashokkumar, V., Cheng, C. K., Park, Y. K., & Show, P. L. (2021). Microalgae and ammonia: a review on inter-relationship. *Fuel*, 303, 121303.

Chen, C. Y., Lu, I. C., Nagarajan, D., Chang, C. H., Ng, I. S., Lee, D. J., y Chang, J. S. (2018). A highly efficient two-stage cultivation strategy for lutein production using heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12. *Bioresource technology*, 253, 141-147.

Chen, J. H., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, C. H., Ng, I. S., y Chang, J. S. (2019). Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. *Bioresource technology*, 278, 17-25.

- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of environmental quality*, 27(2), 261-266.
- da Comunidade Europeia, D. D. C. 89/107/CEE de 21 de Dezembro 1988. *Jornal Oficial n. °L*, 40, 27-33.
- da Costa Cardoso, L. A., Kanno, K. Y. F., y Karp, S. G. (2017). Microbial production of carotenoids A review. *African Journal of Biotechnology*, 16(4), 139-146.
- De Bhowmick, G., Sarmah, A. K., y Sen, R. (2019). Performance evaluation of an outdoor algal biorefinery for sustainable production of biomass, lipid and lutein valorizing flue-gas carbon dioxide and wastewater cocktail. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2019.03.075
- DE LA FEDERACIÓN, D. O. Reglamento de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. *México DF. Secretaría de Salud*, 13.
- Deniz, I. (2020). Scaling-up of *Haematococcus pluvialis* production in stirred tank photobioreactor. *Bioresource technology*, 310, 123434.
- D'Este, M., De Francisci, D., y Angelidaki, I. (2017). Novel protocol for lutein extraction from microalga *Chlorella vulgaris*. *Biochemical engineering journal*, 127, 175-179.
- Dikshit, R., y Tallapragada, P. (2018). Comparative study of natural and artificial flavoring agents and dyes. In *Natural and artificial flavoring agents and food dyes* (pp. 83-111). Academic Press.
- Dinh, C. T., Do, C. V. T., Nguyen, T. P. T., Nguyen, N. H., Le, T. G., & Tran, T. D. (2022). Isolation, purification and cytotoxic evaluation of lutein from mixotrophically grown *Chlorella sorokiniana* TH01. *Algal Research*, 62, 102632.
- Esakkimuthu, S., Krishnamurthy, V., Govindarajan, R., & Swaminathan, K. (2016). Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy*, 88, 126-134.
- EURPEA, U. Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 30 de junio de 1994: relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Comunidades Europeas*, (L237/13).
- Fallahi, A., Rezvani, F., Asgharnejad, H., Nazloo, E. K., Hajinajaf, N., & Higgins, B. (2021). Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, 272, 129878.
- Fariz-Salinas, E. A. (2019). *Identificación de bioproductos de interés comercial en microalgas floculantes nativas del Estado de Nuevo León, México* (Master dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Fortune Business Insights (2020). Food additives and ingredients. Recuperado de: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/carotenoids-market-100180>
- Gayathri, S., Rajasree Radhika, S.R., Suman, T.Y. and Aranganathan, L. (2018). Ultrasound-assisted microextraction of β , ϵ -carotene-3, 3'-diol (lutein) from marine microalgae *Chlorella salina*: effect of different extraction parameters. *Biomass Conv. Bioref.* 8, 791–797.
- Gayathri, S., Rajasree, S. R., Suman, T. Y., Aranganathan, L., Thiuganasambandam, R., y Narendrakumar, G. (2020). Induction of β , ϵ -carotene-3, 3'-diol (lutein) production in green algae *Chlorella salina* with airlift photobioreactor: interaction of different aeration and light-related strategies. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., y Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403–415. doi: 10.1016/j.algal.2016.11.008
- Gong, M., Wang, Y., y Bassi, A. (2017). Process analysis and modeling of a single-step lutein extraction method for wet microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(22), 8089-8099.
- Gong, M., y Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 34(8), 1396-1412.
- Guo, S., Wang, P., Wang, X., Zou, M., Liu, C., & Hao, J. (2020). Microalgae as biofertilizer in modern agriculture. In *Microalgae biotechnology for food, health and high value products* (pp. 397-411). Springer, Singapore.
- Hamed, I. (2016). The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1104-1123.

- Ho, S. H., Chan, M. C., Liu, C. C., Chen, C. Y., Lee, W. L., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2014). Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource technology*, *152*, 275-282.
- Hoh, D., Watson, S., y Kan, E. (2016). Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: a review. *Chemical Engineering Journal*, *287*, 466-473. McGee, D., Archer, L., Fleming, G.T.A. et al. Influence of spectral intensity and quality of LED lighting on photoacclimation, carbon allocation and high-value pigments in microalgae. *Photosynth Res* *143*, 67–80 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00686-x>
- Hu, I. C. (2019). Production of potential coproducts from microalgae. In *Biofuels from algae* (pp. 345-358). Elsevier.
- Inada, E., Shimizu, K., & Osugi, J. (1972). Electrical conductivity of CaSO₄ in aqueous solution under high pressure. *The Review of Physical Chemistry of Japan*, *42*(1), 1-11.
- Jones, S. M., y Burks, A. W. (2008). The spectrum of allergic reactions to foods. *Food allergy: adverse reactions to foods and food additives. 4th ed Malden (MA): Wiley-Blackwell*, 101-9.
- Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, *6*(9), 4607-4638.
- Khalili, A., Najafpour, G. D., Amini, G., & Samkhanian, F. (2015). Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *20*, 284-290.
- Khan, S. A., Sharma, G. K., Malla, F. A., Kumar, A., & Gupta, N. (2019). Microalgae based biofertilizers: A biorefinery approach to phycoremediate wastewater and harvest biodiesel and manure. *Journal of Cleaner production*, *211*, 1412-1419.
- Kirchherr, J., Reike, D., & Hekkert, M. (2017). Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. *Resources, conservation and recycling*, *127*, 221-232.
- Kube, M., Jefferson, B., Fan, L., & Roddick, F. (2018). The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. *Algal research*, *31*, 478-488.
- Kumar, M., Venkatesh, M., y Kumar, P. (2017). Colourants and additives: existing and emerging safety concerns. *Int J Pharm Clin Res*, *9*, 525-533.
- Kumar, N., Banerjee, C., Chang, J. S., & Shukla, P. (2022). Valorization of wastewater through microalgae as a prospect for generation of biofuel and high-value products. *Journal of Cleaner Production*, 132114.
- Kutschera, U., Pieruschka, R., Farmer, S., & Berry, J. A. (2020). The Warburg-effects: basic metabolic processes with reference to cancer development and global photosynthesis. *Plant Signaling & Behavior*, *15*(7), 1776477.
- Ladygin, V.G. 2000. Biosynthesis of carotenoids in the chloroplasts of algae and higher plants. *Rus. J. Plant Physiol.* *47*, 796-814.
- Lee, N., Ko, S. R., Ahn, C. Y., y Oh, H. M. (2018). Optimized co-production of lipids and carotenoids from *Ettlia* sp. by regulating stress conditions. *Bioresource technology*, *258*, 234-239.
- Lehmuskero, A., Skogen Chauton, M., Boström, T., Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes, *Progress in Oceanography* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>.
- Lehto, S., Buchweitz, M., Klimm, A., Straßburger, R., Bechtold, C., y Ulberth, F. (2017). Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *34*(3), 335-355.
- Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high-value products by microalgae. *Industrial Biotechnology*, *10*(3), 169-183.
- Levasseur, W., Perré, P., y Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, *41*, 107545.
- Liyanaarachchi, V. C., Nishshanka, G. K. S. H., Premaratne, R. G. M. M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Malik, A. (2020). Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnology Reports*, *28*, e00538.

- Lokstein, H., Renger, G., & Götze, J. P. (2021). Photosynthetic light-harvesting (antenna) complexes—Structures and functions. *Molecules*, 26(11), 3378.
- Lopez, M. J., y de la Federación, D. O. Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.
- López-Pacheco, I. Y., Silva-Núñez, A., García-Perez, J. S., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Castillo-Zacarias, C., ... & Parra-Saldivar, R. (2021). Phyco-remediation of swine wastewater as a sustainable model based on circular economy. *Journal of Environmental Management*, 278, 111534.
- Low, K. L., Idris, A., y Yusof, N. M. (2020). Novel protocol optimized for microalgae lutein used as food additives. *Food chemistry*, 307, 125631.
- Lubbe, F. V., & Brink, H. G. (2019). CaCO₃ supplementation of low-carbon wastewaters for the cultivation of microalgae: A Study with *Desmodesmus multivariabilis*.
- Mahapatra, D. M., Varma, V. S., Muthusamy, S., y Rajendran, K. (2018). Wastewater algae to value-added products. In *Waste to Wealth* (pp. 365-393). Springer, Singapore.
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology*, 10(10), 1060.
- McAvoy, S. A. (2014). Global regulations of food colors. *Manuf Confect*, 94(9), 77-86.
- McClure, D. D., Nightingale, J. K., Luiz, A., Black, S., Zhu, J., y Kavanagh, J. M. (2019). Pilot-scale production of lutein using *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 44, 101707.
- Metsoviti, M. N., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. T., & Katsoulas, N. (2019). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, 9(1), 31.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2020). Two-phase method of cultivating *Coelastrella* species for increased production of lipids and carotenoids. *Bioresource Technology Reports*, 9, 100366.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., y Adholeya, A. (2016). A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Mirkovic, T., E. E. Ostroumov, J. M. Anna, R. van Grondelle, Govindjee, and G. D. Scholes. 2017. Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chem Rev* 117:249-293.
- Mirón, A. S., Gomez, A. C., Camacho, F. G., Grima, E. M., y Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. In *Progress in industrial microbiology* (Vol. 35, pp. 249-270). Elsevier.
- Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, 752, 142168.
- Molino, A., Mehariya, S., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., Karatza, D., ... y Musmarra, D. (2020). Enhancing biomass and lutein production from *Scenedesmus almeriensis*: Effect of carbon dioxide concentration and culture medium reuse. *Frontiers in plant science*, 11, 415.
- Mondal, S., Bera, S., Mishra, R., & Roy, S. (2022). Redefining the role of microalgae in industrial wastewater remediation. *Energy Nexus*, 6, 100088.
- Mota, I. G. C., Neves, R. A. M. D., Nascimento, S. S. D. C., Maciel, B. L. L., Morais, A. H. D. A., y Passos, T. S. (2021). Artificial Dyes: Health Risks and the Need for Revision of International Regulations. *Food Reviews International*, 1-16.
- Mridha, A., Mukhopadhyay, A., Das, D., Sarkar, B., & Roy Maulik, S. (2021). Sustainable dyeing of silk with natural dyes using natural sources of water. *Journal of The Institution of Engineers (India): Series E*, 102, 61-74.
- Mundoagro. (2023). Producen biomasa enriquecida beneficiosa para la salud a partir de microalgas. <https://mundoagro.cl/producen-biomasa-enriquecida-beneficiosa-para-la-salud-a-partir-de-microalgas/>
- Najafpour, G. (2015). *Biochemical engineering and biotechnology*. Elsevier.

Nigg, J. T., Lewis, K., Edinger, T., y Falk, M. (2012). Meta-analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 51(1), 86-97.

Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H. M., y Guedes, A. C. (2020). Pigments from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 465-492). Academic Press.

Procuraduría Federal del Consumidor, (2020). *Informa Profeco sobre colorantes artificiales en los alimentos*. <https://www.gob.mx/profeco/prensa/informa-profeco-sobre-colorantes-artificiales-en-los-alimentos>,

Rajagopal, P. L., Sreejith, K. R., & Premaletha, K. (2016). Natural colorants as safe additives: A review. *Worldwide J Multidiscipl Res Dev*, 2, 28-32.

Reportlinker (2021). Global Carotenoids Industry. Global Industry Analysts. https://www.reportlinker.com/p01374859/Global-Carotenoids-Industry.html?utm_source=GNW

Reportlinker (2021). Global Lutein Industry. Global Industry Analysts. <https://www.reportlinker.com/p05896164/Global-Lutein-Industry.html>

Rezvani, F., Sarrafzadeh, M. H., Seo, S. H., & Oh, H. M. (2018). Optimal strategies for bioremediation of nitrate-contaminated groundwater and microalgae biomass production. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(27), 27471-27482.

Rosas-Saavedra, C., y Stange, C. (2016). Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. *Carotenoids in nature*, 35-69.

Saini, R. K., y Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry*, 240, 90-103.

Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., y Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 731-738.

Sarayu, K., & Sandhya, S. (2012). Current technologies for biological treatment of textile wastewater—a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167, 645-661.

Schlesinger, A., Eisenstadt, D., Bar-Gil, A., Carmely, H., Einbinder, S., y Gressel, J. (2012). Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories, overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1023–1030. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.011

Seale, D. B., Boraas, M. E., & Warren, G. J. (1987). Effects of sodium and phosphate on growth of cyanobacteria. *Water Research*, 21(6), 625-631.

Sforza, E., Pastore, M., Spagni, A., & Bertucco, A. (2018). Microalgae-bacteria gas exchange in wastewater: how mixotrophy may reduce the oxygen supply for bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(28), 28004-28014.

Shahid A., Malik, S. Zhu, H. Xu, J. Nawaz, M.Z. Nawaz, S. Asraful Alam, Md. Mehmood, M.A. (2019). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review, *Science of the Total Environment* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>

Sharma, R., Mishra, A., Pant, D., & Malaviya, P. (2022). Recent advances in microalgae-based remediation of industrial and non-industrial wastewaters with simultaneous recovery of value-added products. *Bioresource Technology*, 344, 126129.

Singh, R. N., y Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347-2353.

Skjånes K, Rebours C, Lindblad P. (2012). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Crit Rev Biotechnol* 2012:1–44.

Solovchenko, A. E., Ismagulova, T. T., Lukyanov, A. A., Vasilieva, S. G., Konyukhov, I. V., Pogosyan, S. I., ... & Gorelova, O. A. (2019). Luxury phosphorus uptake in microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 2755-2770.

- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. 2008. Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*. *Rus. J. Plant Physiol.* 55, 455-462. <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS1021443708040043>
- Sosa-Hernández, J. E., Romero-Castillo, K. D., Parra-Arroyo, L., Aguilar-Aguila-Isaías, M. A., García-Reyes, I. E., Ahmed, I., ... y Iqbal, H. (2019). Mexican microalgae biodiversity and state-of-the-art extraction strategies to meet sustainable circular economy challenges: high-value compounds and their applied perspectives. *Marine drugs*, 17(3), 174.
- Stevens, L. J., Kuczek, T., Burgess, J. R., Hurt, E., y Arnold, L. E. (2011). Dietary sensitivities and ADHD symptoms: thirty-five years of research. *Clinical pediatrics*, 50(4), 279-293.
- Stich, E. (2016). Food color and coloring food: quality, differentiation and regulatory requirements in the European Union and the United States. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 3-27). Woodhead Publishing.
- Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., y Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1-16.
- Trabelsi, L., Mnari, A., Abdel-Daim, M. M., Abid-Essafi, S., y Aleya, L. (2016). *Therapeutic properties in Tunisian hot springs: first evidence of phenolic compounds in the cyanobacterium Leptolyngbya sp. biomass, capsular polysaccharides and releasing polysaccharides*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). doi:10.1186/s12906-016-1492-3
- Tsoglin, L. N., Gabel', B. V., Fal'kovich, T. N., y Semenenko, V. E. (1996). Closed photobioreactors for microalgal cultivation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 43(1), 131-136.
- Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Akrotos, C. S., Aggelis, G., Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M., y Vayenas, D. V. (2017). *Biotreatment of raisin and winery wastewaters and simultaneous 75 biodiesel production using a Leptolyngbya - based microbial consortium*. *Journal of Cleaner Production*, 148, 185–193. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.02.026
- Van Bever, H. P., Docx, M., y Stevens, W. J. (1989). Food and food additives in severe atopic dermatitis. *Allergy*, 44(8), 588-594.
- Vaquero, I., Mogedas, B., Ruiz-Domínguez, M. C., Vega, J. M., y Vilchez, C. (2014). Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga. *Algal Research*, 6, 70-77.
- Vijayakumar, S., y Menakha, M. (2015). *Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review*. *Journal of Acute Medicine*, 5(1), 15–23. doi: 10.1016/j.jacme.2015.02.004
- Vojdani, A., y Vojdani, C. (2015). Immune reactivity to food coloring. *Altern Ther*, 21, 1-100.
- Wan, C., Alam, M. A., Zhao, X. Q., Zhang, X. Y., Guo, S. L., Ho, S. H., y Bai, F. W. (2015). Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresource technology*, 184, 251-257.
- Wu, X., & Merchuk, J. C. (2001). A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chemical engineering science*, 56(11), 3527-3538.
- Xie Y-P, Ho S-H, Chen C-Y, Chen C-NN, Liu C-C, Ng I-S y Jing KJ. (2014) Simultaneous enhancement of CO2 fixation and lutein production with thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51 using a repeated fedbatch cultivation strategy. *Biochem Eng J.* 2014; 86:33–40. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X14000485>
- Xie, B., Gong, W., Yu, H., Tang, X., Yan, Z., Luo, X., ... & Liang, H. (2018). Immobilized microalgae for anaerobic digestion effluent treatment in a photobioreactor-ultrafiltration system: Algal harvest and membrane fouling control. *Bioresource technology*, 268, 139-148.
- Xie, Y., Ho, S. H., Chen, C. N. N., Chen, C. Y., Ng, I. S., Jing, K. J., ... y Lu, Y. (2013). Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource technology*, 144, 435-444.
- Xie, Y., Li, J., Ho, S. H., Ma, R., Shi, X., Liu, L., y Chen, J. (2020). Pilot-scale cultivation of *Chlorella sorokiniana* FZU60 with a mixotrophy/photoautotrophy two-stage strategy for efficient lutein production. *Bioresource technology*, 314, 123767.

Young-Lorenz, J. (2013). Portfolio analysis of carbon sequestration technologies and barriers to adoption. Thesis (M.Sc. (Geo)) University of Western Australia, 2013.

Yusuf, M., Shabbir, M., y Mohammad, F. (2017). Natural colorants: Historical, processing, and sustainable prospects. *Natural products and bioprospecting*, 7(1), 123-145.

Zhao, X., Ma, R., Liu, X., Ho, S. H., Xie, Y., y Chen, J. (2019). Strategies related to light quality and temperature to improve lutein production of marine microalga *Chlamydomonas* sp. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42(3), 435-443.

Zheng, H., Wang, Y., Li, S., Nagarajan, D., Varjani, S., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2022). Recent advances in lutein production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 153, 111795.

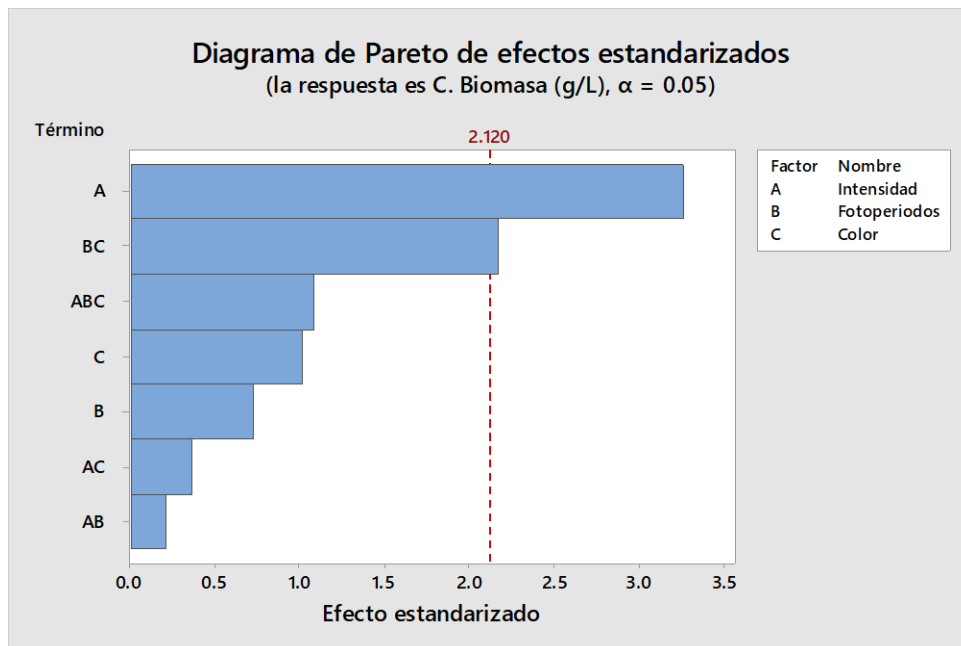
Žmitek, K., Žmitek, J., Butina, M. R., Hristov, H., Pogačnik, T., y Pravst, I. (2020). Dietary lutein supplementation protects against ultraviolet-radiation-induced erythema: Results of a randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of Functional Foods*, 75, 104265.

Anexo 1

Análisis de Varianza Biomasa

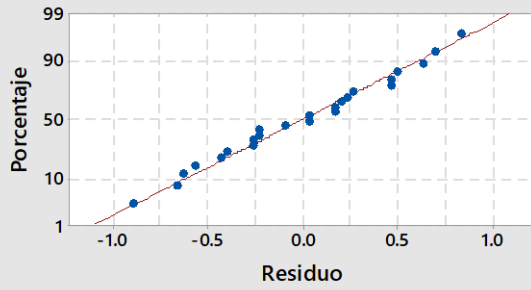
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	5.8000	0.82857	2.61	0.053
Lineal	3	3.8683	1.28944	4.06	0.025
Intensidad	1	3.3750	3.37500	10.63	0.005
Fotoperiodos	1	0.1667	0.16667	0.52	0.479
Color	1	0.3267	0.32667	1.03	0.326
Interacciones de 2 términos	3	1.5567	0.51889	1.63	0.221
Intensidad*Fotoperiodos	1	0.0150	0.01500	0.05	0.831
Intensidad*Color	1	0.0417	0.04167	0.13	0.722
Fotoperiodos*Color	1	1.5000	1.50000	4.72	0.045
Interacciones de 3 términos	1	0.3750	0.37500	1.18	0.293
Intensidad*Fotoperiodos*Color	1	0.3750	0.37500	1.18	0.293
Error	16	5.0800	0.31750		
Total	23	10.8800			

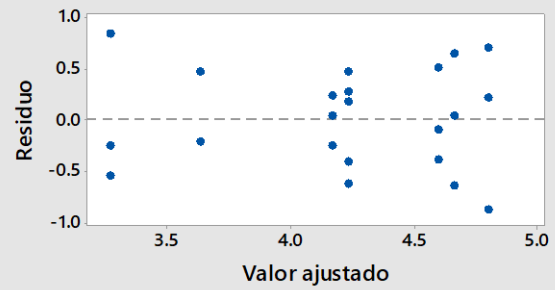


Gráficas de residuos para C. Biomasa (g/L)

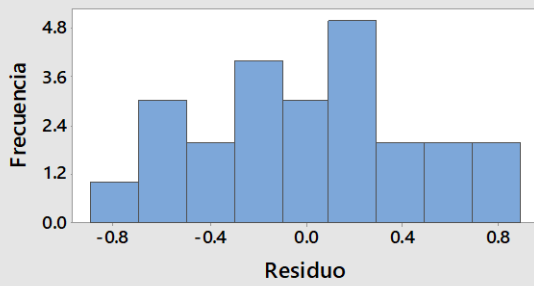
Gráfica de probabilidad normal



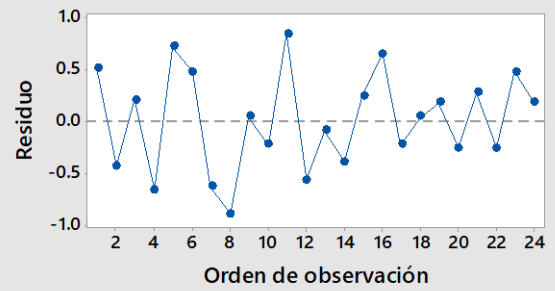
vs. ajustes



Histograma



vs. orden

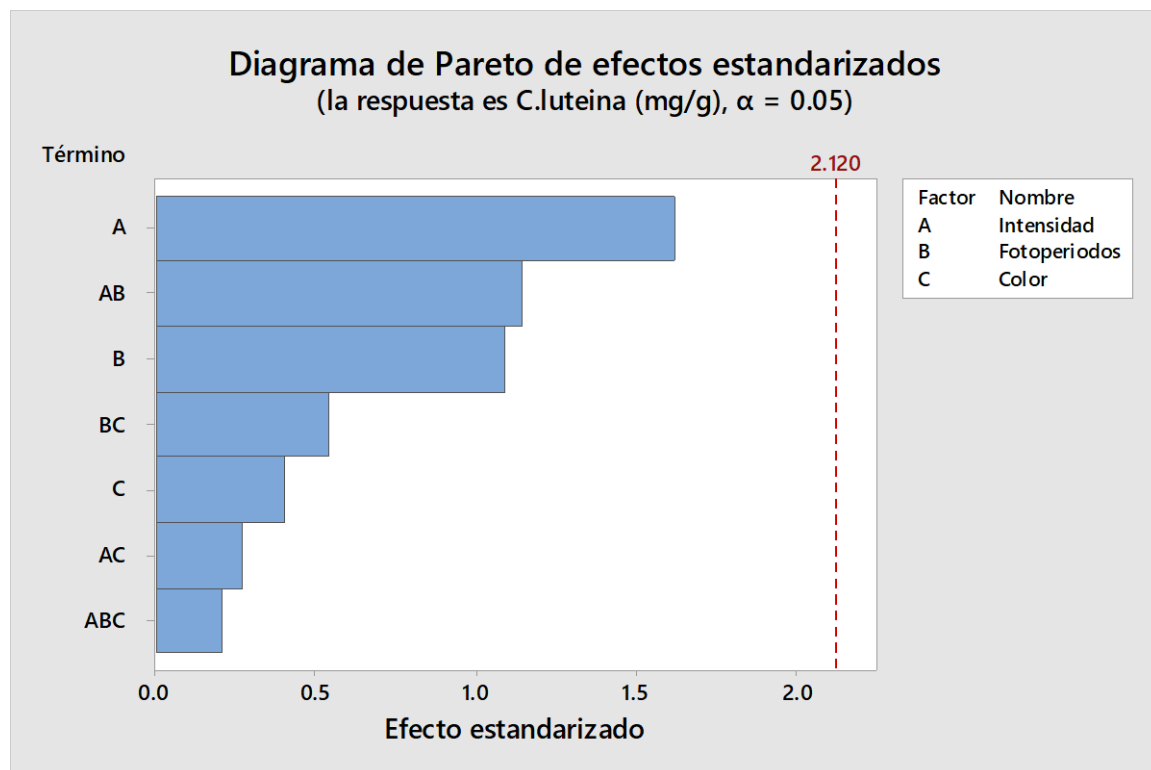


Anexo 2

Análisis de Varianza Concentración de Luteína

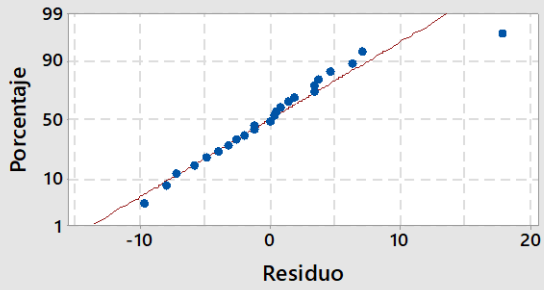
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	279.15	39.879	0.81	0.590
Lineal	3	194.61	64.868	1.32	0.302
Intensidad	1	128.55	128.553	2.62	0.125
Fotoperiodos	1	58.16	58.156	1.18	0.293
Color	1	7.90	7.896	0.16	0.694
Interacciones de 2 términos	3	82.36	27.455	0.56	0.650
Intensidad*Fotoperiodos	1	64.41	64.412	1.31	0.269
Intensidad*Color	1	3.57	3.575	0.07	0.791
Fotoperiodos*Color	1	14.38	14.378	0.29	0.596
Interacciones de 3 términos	1	2.18	2.180	0.04	0.836
Intensidad*Fotoperiodos*Color	1	2.18	2.180	0.04	0.836
Error	16	785.65	49.103		
Total	23	1064.80			

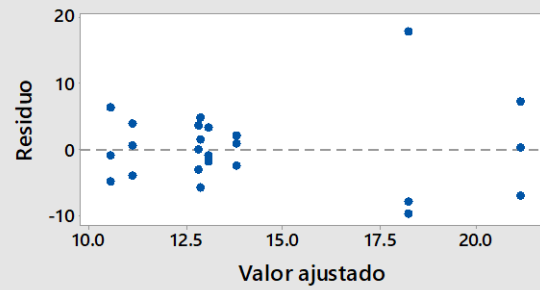


Gráficas de residuos para C.luteina (mg/g)

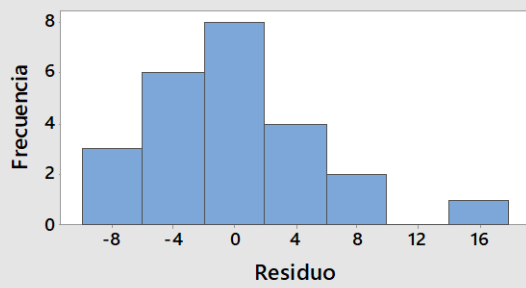
Gráfica de probabilidad normal



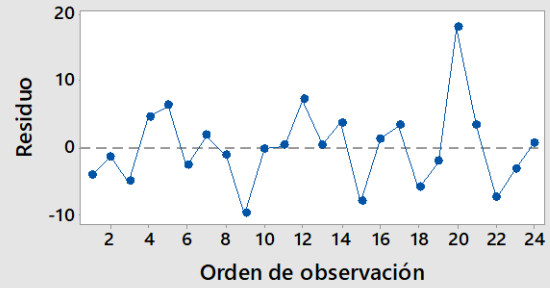
vs. ajustes



Histograma



vs. orden



Anexo 3

Prueba de Kruskal Wallis

Prueba de Kruskal-Wallis: Clut (mg/g)¹ vs. Factores

Estadísticas descriptivas

Factores	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
15/12/c	3	9.3127	8.7	-1.00
15/12/F	3	11.8056	12.7	0.04
15/24/c	3	14.2252	12.3	-0.04
15/24/F	3	11.4923	9.7	-0.74
5/12/c	3	10.2577	11.7	-0.22
5/12/f	3	21.3885	19.3	1.79
5/24/C	3	12.7546	12.0	-0.13
5/24/f	3	14.5629	13.7	0.31
General	24		12.5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

GL	Valor H	Valor p
7	4.31	0.744

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.