

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Extracción de una enzima RuBisCO de origen microbiano para su aplicación en el desarrollo de procesos biotecnológicos

Por

LBG Yessica Itzel Silva Méndez


18 Oct. 23

Vo.Bo.

18/10ct/23

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada

Octubre, 2023

Extracción de una enzima RuBisCO de origen microbiano para su aplicación en el desarrollo de procesos biotecnológicos.

Revisión de la Tesis:

DRA. MELISSA MARLENE RODRÍGUEZ DELGADO

Co-asesora de tesis

DRA. EVANGELINA RAMÍREZ LARA

Comité tutorial

DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ

Comité tutorial

DRA. GABRIELA ELIZABETH QUINTANILLA VILLANUEVA

Comité tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

Extracción de una enzima RuBisCO de origen microbiano para su aplicación en el desarrollo de procesos biotecnológicos.

Aprobación de la Tesis:

DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU

Presidente

DRA. EVANGELINA RAMÍREZ LARA

Secretaria

DRA. GABRIELA ELIZABETH QUINTANILLA VILLANUEVA

Vocal

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

DEDICATORIA

Para Andy, mi constante motivación.

Gracias por dejarme aprender de tu amor y fuerza inagotable para seguir adelante, desde el día en que llegaste a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional en todo momento. A mis padres, por su confianza, sus sacrificios, por iluminar mi camino y ser mis pilares más fuertes cuando más los necesitaba. Este logro se los debo a ustedes, a cada día de trabajo y cada decisión tomada por el bien de mi educación. Los amo profundamente.

Mi eterno agradecimiento a Elena, la mejor compañera de laboratorio que pude haber encontrado, gracias por no dejarme perder la cordura en el proceso... sola.

A José Luis y Joaquín, por el cariño, los desvelos, las ideas y el esfuerzo para apoyarme a superar cada obstáculo a lo largo de este camino.

Mis agradecimientos a mi asesor, por compartir su experiencia para guiarme a lo largo de este proyecto. A mi co-asesora, por su paciencia, dedicación y sus valiosos consejos en esta etapa.

Gracias a la Universidad Autónoma de Nuevo León, al programa de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y especialmente al Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología por los retos y las oportunidades que me han brindado, así como a los docentes que me dieron las bases para desarrollar el presente trabajo.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Nombre: Yessica Itzel Silva Méndez

Octubre, 2023

Número de páginas: 95

Área de estudio: Producción microbiana
de RuBisCO

“Extracción de una enzima RuBisCO de origen microbiano para su potencial aplicación
en el desarrollo de procesos biotecnológicos”

Propósito y Método de Estudio:

Este estudio tiene como finalidad demostrar la capacidad de una enzima Ribulosa – 1,5 Bisfosfato Carboxilasa Oxigenasa (RuBisCO) de origen microbiano para llevar a cabo una reacción de conversión del sustrato ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) a 3-fosfoglicerato (3-PGA) en un ensayo *in-vitro*. Esta enzima fue obtenida a partir de un microorganismo fotoautótrofo nativo del estado de Nuevo León, con la finalidad de abrir una nueva línea de investigación orientada a desarrollar en un futuro un método alternativo y eficaz para el secuestro de CO₂.

Conclusiones y contribuciones:

Con base en la morfología observada, durante el presente trabajo se aislaron dos microorganismos fotoautótrofos, los cuales se pueden considerar como candidatos a *Scenedesmus* y *Chlorella*. Además, se obtuvo un consorcio de microalgas constituidos por

especies del género *Selenastrum* y *Closterium*. Estas especies demostraron poseer una gran habilidad para adaptarse a las distintas condiciones fisicoquímicas que se encontraron a lo largo del estado, incluyendo aguas con altos valores en la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO). Debido a su destacada producción de biomasa, se seleccionó al microorganismo candidato a *Chlorella* como microorganismo modelo para llevar a cabo la producción de la enzima RuBisCO. Con la finalidad de mantener el cultivo de esta cepa viable a lo largo del proyecto, se realizó un estudio de preservación donde se probaron diferentes agentes crioprotectores, buscando la mayor recuperación de la viabilidad después de la reactivación de este microorganismo crioconservado. Estos agentes fueron el CH₃OH al 6 % y DMSO al 8 %. Por otro lado, se realizaron un par de diseños de experimentos, tanto exploratorio como de optimización (Plackett-Burman y Diseño Central Compuesto, respectivamente), con la finalidad de encontrar los parámetros más importantes para la producción de biomasa, resultando que el tipo de contenedor, los fotoperiodos y la temperatura eran los parámetros más relevantes, quedando establecidos de la siguiente manera: una temperatura de 33.4 °C, fotoperiodo de 12:12 y una intensidad de luz de 220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y contenedor tipo matraz. Cabe mencionar que, al incluirse en el rango de optimización los puntos alfa se predice que las mejores condiciones son una temperatura de 42.6 °C, fotoperiodo de 18:6 y una intensidad de luz de 423 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir de la producción de biomasa, se realizó un proceso de lisado para recuperar la fracción pesada del extracto crudo, donde se esperaba encontrar la enzima RuBisCO, cuya presencia fue evidenciada por electroforesis al observar la aparición de las bandas características de esta enzima. Dicha estructura está conformada típicamente de 8 subunidades grandes (52 - 54 kDa) y 8 subunidades

pequeñas (10 – 17 kDa). De la enzima RuBisCO recuperada a partir del extracto crudo fue posible realizar una prueba de concepto para evaluar la capacidad de esta enzima para utilizar HCO_3^- como fuente de carbono y catalizar la reacción enzimática en la que el sustrato ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) se convierte a 3-fosfoglicerato (3-PGA) de manera *in-vitro*, siendo una potencial candidata para ser empleada como herramienta para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas enfocadas al secuestro de carbono. Finalmente, como un ejercicio de innovación, se desarrolló un prototipo de fotobiorreactor, el cual representa una alternativa asequible y de fácil acceso, capaz de competir en sus prestaciones y eficacia contra incubadoras comerciales.

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Asesor

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN	I
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2.....	7
ANTECEDENTES	7
CAPÍTULO 3.....	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
3.1 Hipótesis	10
3.2 Objetivo General.....	10
3.2.1 Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO 4.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1 Estrategia General Del Proyecto.....	12
4.2 Localización.....	13
4.3 Equipos y Reactivos.....	13
4.4 Tipo de estudio.....	15
4.5 Muestreo de Microorganismos Nativos Fotosintéticos del Estado de Nuevo León	15
4.5.1 Toma de Muestra.....	16
4.5.2 Análisis Físicoquímico.....	17
4.5.3 Registro Fotográfico	18
4.6 Aislamiento y Selección de un Microorganismo Fotosintético para la Producción de RuBisCO.....	18
4.7 Desarrollo de un Método de Criopreservación Específico para Microalgas Seleccionadas.....	19
4.8 Optimización de Producción de Biomasa de la Microalga Seleccionada	20
4.8.1 Identificación de Factores Relevantes con un Diseño Plackett-Burman.....	20
4.9 Separación y Recuperación de la Fracción Pesada del Lisado Citoplasmático para la Obtención de la Enzima RuBisCO de la Cepa Seleccionada	23
4.9.1 Lisis Celular	23
4.9.2 Cuantificación de Proteínas	24

4.9.3 Prueba de Electroforesis SDS-PAGE.....	25
4.9.4 Fraccionamiento por Tamaño de Corte	25
4.10 Condiciones de Reacción de la Enzima RuBisCO.....	26
4.11 Comparación de la Enzima RuBisCO del Microorganismo Seleccionado Contra una Enzima Comercial	26
4.12 Prueba Concepto para Evaluar la Conversión de RuBP a 3-PGA por Acción de la Enzima RuBisCO y la Factibilidad Tecnológica de su Obtención a Nivel de Laboratorio	27
4.13 Disposición de Residuos	29
CAPÍTULO 5.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 Muestreo de Microorganismos Nativos Fotosintéticos del Estado de Nuevo León	30
5.1.1 Selección de Sitios de Muestreo	30
5.1.2 Registro Fotográfico	33
5.2 Aislamiento y Selección de un Microorganismo Fotosintético para la Producción de RuBisCO.....	39 38
5.3 Desarrollo de un Método de Criopreservación Específico para Microalgas Seleccionadas	45
5.4 Optimización de Producción de Biomasa de la Microalga Seleccionada.....	46
5.4.1 Identificación de Factores Relevantes con un Diseño Plackett-Burman.....	46
5.4.2 Estudio de Optimización Basado en un Diseño Central Compuesto	51 52
5.5 Separación y Recuperación de la Fracción Pesada del Lisado Citoplasmático para la Obtención de la Enzima RuBisCO de la Cepa Seleccionada	59
5.5.1 Electroforesis	59
5.5.2 Fraccionamiento por Tamaño de Corte	60 61
5.6 Condiciones de Reacción de la Enzima RuBisCO	62 63
5.7 Comparación de la Enzima RuBisCO del Microorganismo Seleccionado Contra una Enzima Comercial.....	64 65
5.8 Prueba Concepto para Evaluar la Conversión de RuBP a 3-PGA por Acción de la Enzima RuBisCO y la Factibilidad Tecnológica de su Obtención a Nivel de Laboratorio	65 66
CAPÍTULO 6.....	71
CONCLUSIONES	71
6.1 Perspectivas	73
CAPÍTULO 7.....	74
REFERENCIAS.....	74
CAPITULO 8.....	81
APÉNDICE.....	81
8.1 APÉNDICE 1: MEDIOS UTILIZADOS	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Equipos.....	13
Tabla 2. Reactivos.....	14
Tabla 3. Pruebas incluidas en el análisis fisicoquímico de las muestras de agua seleccionadas..	17
Tabla 4. Factores y niveles a evaluar mediante un Diseño Plackett-Burman.	20
Tabla 5. Diseño Plackett-Burman.	21
Tabla 6. Factores más relevantes para la optimización de producción de biomasa a escala laboratorio.....	22
Tabla 7. Diseño Central Compuesto	22
Tabla 8. Fotografías de los sitios de muestreo	31
Tabla 9. Microorganismos encontrados en la muestra del sitio 1.	34
Tabla 10. Microorganismos encontrados en la muestra del sitio 2	35
Tabla 11. Microorganismos encontrados en la muestra del sitio 4.....	36
Tabla 12. Microorganismos encontrados en la muestra del sitio 5	38 37
Tabla 13. Resultados del análisis fisicoquímico realizado a la muestra M1	40
Tabla 14. Resultados del análisis fisicoquímico realizado a la muestra M2	42 41
Tabla 15. Resultados del análisis fisicoquímico realizado a la muestra M5	43
Tabla 16: Productividad reportada para <i>Chlorella</i>	44 43
Tabla 17. Resultados del Diseño Plackett-Burman.....	47
Tabla 18: ANOVA para el Modelo Factorial.	49
Tabla 19. Resultados de la optimización realizada mediante un CCD circunscrito.....	51 52
Tabla 20. Condiciones definidas para la ejecución del CCD que no fueron incluidas en el análisis	52 53
Tabla 21: ANOVA para un Modelo Cúbico Reducido	53 54
Tabla 22. Comparación entre la respuesta obtenida en la prueba confirmatoria y su predicción	56 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de concentración de carbono en microalgas.....	3
Figura 2: Mapa del Estado de Nuevo León con las ubicaciones de los puntos de muestreo seleccionados	16
Figura 3: Morfología macroscópica en los tubos con medio BG-11 inoculados con las muestras recolectadas. (A) La Laguna, Higuera, N.L., (B) Río Salinas, Marín, N.L, (C) Presa del Cerro Prieto, Linares, N.L., (D) Río San Juan, General Bravo, N.L, (E) Colonia Residencial Vidriera, Mty. N.L.....	3334
Figura 4: Morfología en aislamiento a partir de la muestra 1.....	3940
Figura 5: Morfología en aislamiento a partir de la muestra 2.....	41
Figura 6: Morfología en aislamiento a partir de la muestra 5.....	4344
Figura 7: Morfología microscópica encontrada en la muestra 5, típica del género <i>Chlorella</i>	4445
Figura 8: Comportamiento del cultivo reactivado al cabo de 7 días de congelación.....	4647
Figura 9: Gráfica de Pareto	4849
Figura 10: Distribución de color en el espectro de las lámparas LED utilizadas.....	5152
Figura 11: Gráfica de superficie de respuesta tridimensional correspondiente al crecimiento de biomasa respecto a la temperatura y fotoperiodo.....	5456
Figura 12: Gráfica de superficie de respuesta tridimensional correspondiente al crecimiento de biomasa respecto a la temperatura e intensidad de luz.	5556
Figura 13: Gráfica de superficie de respuesta tridimensional correspondiente al crecimiento de biomasa respecto al fotoperiodo e intensidad de luz.....	5557
Figura 14: Cultivos obtenidos durante la optimización	5859
Figura 15: Gel de electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo.....	60
Figura 16. Comparación del espectro en el extracto	61
Figura 17: Perfiles correspondientes al barrido realizado por espectrofotometría de la enzima pura y el extracto enzimático durante el proceso de retención por membranas de 100kDa.	62
Figura 18: Condiciones de reacción del extracto RuBisCO.....	6364
Figura 19: Condiciones de reacción con la enzima RuBisCO comercial	64
Figura 20: Comparación de los perfiles entre RuBisCO comercial y extracto RuBisCO.....	6566
Figura 21: Reactivos y productos de la reacción mediada por RuBisCO (Yen <i>et al.</i> , 1998) ...	6667
Figura 22: Perfil de reacción a lo largo de 2 horas.	6869
Figura 23: Prototipo de fotobiorreactor para la producción de microalgas.....	6970

LISTA DE SÍMBOLOS

ACP	Agente crioprotector
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ANOVA	Análisis de varianza
CCD	Diseño central compuesto (Por sus siglas en inglés Central composite design)
D.O.	Densidad óptica
BBM	Medio Basal Bold (Por sus siglas en inglés Basal Bold Medium)
ITS	Espaciador transcrito interno (Por sus siglas en inglés Internal transcribed spacer)
MWCO	Peso molecular aislado (Por sus siglas en inglés Molecular Weight Cut-Off)
PG	Fosfoglicolato
3-PGA	3-Fosfoglicerato / Ácido 3-fosfoglicérico
rpm	Revoluciones por minuto
RuBisCO	Ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RSM	Metodología de superficie de respuesta (Por sus siglas en inglés Response surface methodology)
RuBP	Ribulosa 1-5 bisfosfato
u.c. Pt-Co	Unidades de color Platino - Cobalto
V	Volts
W	Watts

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el CO₂ representa un 75% de las emisiones de gases de efecto invernadero a escala mundial. De forma que, el incremento en estos niveles ha exacerbado los efectos del cambio climático trayendo como consecuencia condiciones ambientales severas como inundaciones, sequías, fenómenos meteorológicos extremos, acidificación de los océanos y derretimiento de glaciares durante la última década (Adebayo *et al.*, 2021, 2022; Prasad *et al.*, 2021).

Con el fin de controlar el impacto ecológico que resulta del calentamiento global, se han realizado varios acuerdos internacionales como el Protocolo de Kyoto en 1997, el Acuerdo de París en 2015 y la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático de 2021, en donde se enfatizó que no es suficiente reducir las emisiones ya establecidas por cada país, sino que es necesario reducir 28 gigatoneladas de CO₂ equivalente para limitar el aumento de la temperatura global y así mantenerla por debajo de 1.5 °C (Adebayo *et al.*, 2022). Sin embargo, a este día, reducir las emisiones ya no es suficiente, por lo que el Panel Intergubernamental en Cambio Climático (IPCC) estimó que para limitar la temperatura a 1.5 °C por encima de los niveles preindustriales, las emisiones deben llegar a una cantidad neta de 0 para 2050. Por este motivo, el avance tecnológico debe ir más allá de la reducción de emisiones y considerar las tecnologías emergentes orientadas a la captura de CO₂ atmosférico (Weigmann, 2019).

En este sentido, es importante considerar que la fotosíntesis es un mecanismo natural para la captura de CO₂ que puede ser aplicado en beneficio de las acciones tomadas para mitigar el cambio climático. La fotosíntesis es el proceso bioquímico a través del cual, los organismos fotoautótrofos utilizan la energía de la luz para convertir el CO₂ atmosférico en carbohidratos, los cuales representan la base para el sustento de la vida en nuestro planeta (Zhang *et al.*, 2021). Este proceso puede dividirse en las reacciones dependientes de luz (fase luminosa) e independientes de luz (fase autótrofa) (Prasad *et al.*, 2021). Durante la fase luminosa la energía de la luz es utilizada para transferir electrones provenientes del agua hacia el NADP⁺ para obtener NADPH y O₂, a raíz de este proceso, se obtiene ATP. Durante la fase autótrofa se aprovecha el NADPH y ATP obtenidos para fijar CO₂, reducir el carbono y formar triosas (C₃H₆O₃) a través del Ciclo de Calvin-Benson (Figura 1) (Blanken *et al.*, 2013). Este proceso es mediado por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), la cual, al estar distribuida en los tres dominios de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya, es responsable de la fijación de más del 90% del carbono inorgánico que es metabolizado y convertido en biomasa en el planeta. Esto ocurre mediante la carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) (Erb & Zarzycki, 2018). En esta reacción, el residuo de lisina del sitio catalítico de RuBisCO es carbamilado por una molécula de carbono y por la adición de un ion Mg²⁺, de esta manera la enzima se activa y es capaz de captar una molécula de CO₂ para su unión con RuBP, de esta incorporación se obtienen las 2 moléculas de 3-PGA que serán utilizadas en los siguientes pasos del Ciclo de Calvin-Benson para producir otras moléculas orgánicas (Stec, 2012).

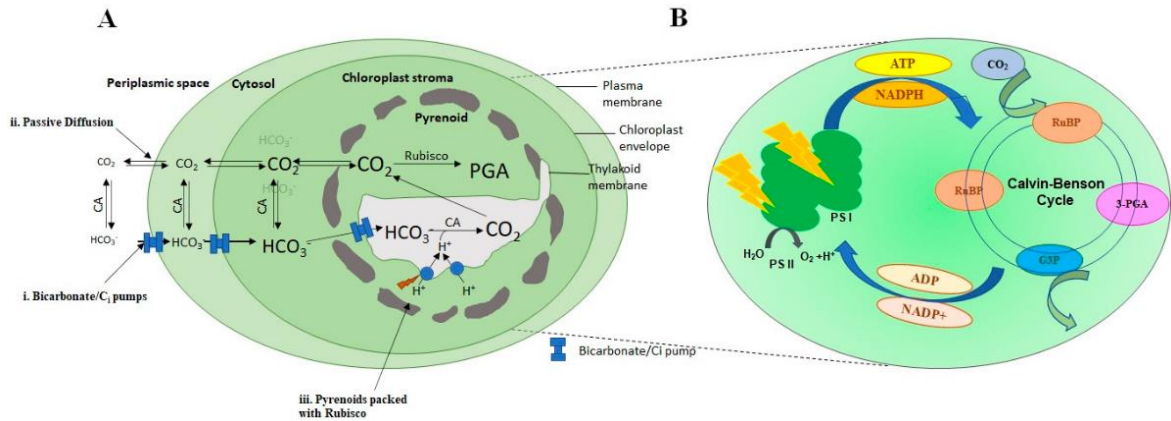


Figura 1. Mecanismos de concentración de carbono en microalgas. A) (i) Bombas de transporte de bicarbonato/Ci, (ii) Difusión pasiva de CO₂ a través de los poros de membrana y (iii) Pirenoide que contiene RuBisCO. B) Aumento del cloroplasto, en donde ocurre el Ciclo de Calvin-Benson (Prasad *et al.*, 2021).

No obstante, se ha observado que esta enzima tiene una baja eficiencia catalítica y baja especificidad por su sustrato, ya que se sabe que puede llevar a cabo un proceso denominado fotorrespiración, en la que RuBisCO ejerce actividad oxigenasa que produce 2-fosfoglicolato (2-PG) en un proceso de mayor consumo de energía, considerándose como un factor limitante en el proceso de fijación de CO₂ (Hagemann & Bauwe, 2016). Sin embargo, las microalgas poseen mecanismos de concentración de carbono para mantener concentraciones de CO₂ en los rangos en que RuBisCO los requiere para favorecer la carboxilación. De este modo, puede obtener carbono inorgánico (Ci) del medio y utilizarlo cuando lo requiera, en la forma en que se encuentre; por ejemplo, a pH 7 - 9, que es en el que suelen desarrollarse mejor, el HCO₃⁻ prevalece por encima de las demás formas de Ci. Estos mecanismos consisten en (1) bombas de transporte de bicarbonato/Ci, (2) difusión pasiva de CO₂ a través de los poros de membrana y (3) entrega

del Ci al pirenoide o carboxisoma, en donde ocurre la carboxilación (Figura 1) (Prasad *et al.*, 2021).

Por lo anterior, es necesario realizar estudios con diversas enzimas RuBisCO provenientes de distintos microorganismos fotosintéticos para identificar aquellas enzimas que puedan ser candidatas para realizar procesos más eficientes de fijación de CO₂.

En este sentido, las microalgas unicelulares son microorganismos fotosintéticos autótrofos que se encuentran de forma colonial u organizada en tejidos simples filamentosos; contienen clorofila y son encontradas en agua dulce y hábitats marinos. En esta clasificación se incluyen a las cianobacterias (microorganismos procariotas) y microorganismos fotosintéticos eucariotas, lo que los convierte en un grupo muy diverso y con amplias posibilidades de investigación, ya que, se estima que apenas se conoce poco más de la mitad de la totalidad de sus especies (Guiry, 2012). Por este motivo las microalgas han sido de especial interés industrial, no solo debido a su capacidad de producir una gran cantidad de compuestos de alto valor, como lípidos para la producción de biocombustibles, sino por el aprovechamiento de los nutrientes contenidos en aguas residuales para la producción de pigmentos, suplementos alimenticios, enzimas, polímeros, péptidos, proteínas recombinantes, y otros metabolitos con propiedades antimicrobianas, antiparasitarias y antifúngicas, así como en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas como la producción de nanopartículas para la liberación de fármacos (Khaligh & Asoodeh, 2022; Khavari *et al.* 2021; Markou *et al.*, 2014). Además, la biomasa residual de estos procesos puede ser utilizada como alimento de ganado, fertilizante o ser fermentada para la obtención de etanol (Feng *et al.*, 2014).

Por otro lado, el aprovechamiento de las microalgas enfocado a la captura de CO₂ presenta una oportunidad con gran potencial de desarrollo, ya que el fitoplancton marino es el responsable de la mitad de la captura total a nivel global, con la fijación de hasta ~50 gigatoneladas de CO₂ por año (Prasad *et al.*, 2021). Otra ventaja de estos microorganismos se basa en el hecho de que la biomasa se considera como un recurso de energía renovable que no emite carbono (K. Lee *et al.*, 2014a). Todas estas consideraciones permiten establecer a la fijación biológica de CO₂ como una alternativa eficiente en costos y en efectos medioambientales en comparación a otros métodos físicos y químicos (Prasad *et al.*, 2021).

Tomando en cuenta estos aspectos, el presente estudio se centrará en las microalgas unicelulares, ya que se caracterizan por ser los microorganismos fotosintéticos de más rápido crecimiento. Esto les permite completar un ciclo de crecimiento completo en pocos días bajo las condiciones adecuadas de luz, pH, temperatura, agua, CO₂ y nutrientes (K. Lee *et al.*, 2014b), además de tener el potencial para producir hasta 5 veces más biomasa por unidad de área terrestre que los cultivos vegetales tradicionales (Subramanian & Sayre, 2022).

Considerando que el hábitat natural de las cepas de microalgas utilizadas en el presente estudio se encuentra en la región, se espera que éstas se encuentren mejor adaptadas a las condiciones específicas de la zona, facilitando su potencial cultivo a gran escala (Lee *et al.*, 2014a). Por este motivo, el presente estudio representa una oportunidad para analizar la biodiversidad de microorganismos fotosintéticos presentes en el estado de Nuevo León con la intención de conocer el potencial desarrollo de tecnologías de aplicación industrial en la captura de CO₂ atmosférico para la mitigación de su impacto

ambiental. Lo anterior como consecuencia de la obtención de una enzima RuBisCO proveniente de un microorganismo endógeno de Nuevo León, capaz de mediar la conversión de RuBP a 3-PGA durante procesos de fijación de CO₂.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

En 1947, Wildman y Bonner, aislaron por primera vez la enzima RuBisCO a partir de un tejido vegetal. En años posteriores, se realizaron estudios en los que se identificaron a los productos intermedios de la fotosíntesis (Calvin & Benson, 1948), así como el rol de la ribulosa-1,5- bisfosfato como un producto inicial de la fotosíntesis elucidando que su oxidación producía 3-fosfoglicerato (3-PGA) y 2-fosfoglicolato (2-PG). Sin embargo, la identificación de RuBisCO se realizó formalmente hasta 1957 por Dörner *et al.* gracias a su actividad de carboxilación, mientras que su relación con el CO₂ no fue reconocida sino hasta 1969 (Cooper *et al.* 1969).

Para el año 1989, se demostró que la localización de RuBisCO en los carboxisomas juegan un papel importante en los mecanismos de concentración de CO₂ en las cianobacterias (Price & Badger, 1989). Con esto, se pudo observar directamente el efecto que tiene el aumento en la temperatura sobre la capacidad de la RuBisCO activasa, provocando así su inactivación. Esta respuesta, además del estudio mediante intercambio de gases, explica el comportamiento de la fotosíntesis en respuesta a altas temperaturas y aumento en la concentración de CO₂ (Crafts-Brandner & Salvucci, 2000).

Tomando en cuenta las observaciones realizadas hasta el momento, referentes a la capacidad fotosintética de las algas y cianobacterias para la captura de CO₂, la investigación de la actividad enzimática de RuBisCO tomó una gran relevancia. Por ello, se consideró su aplicación para atender el problema emergente del aumento en la

concentración de CO₂, componente principal de los gases de efecto invernadero. Actualmente, las estrategias de Captura de Carbono y Almacenamiento (CCS) y Captura de Carbono y Utilización (CCU) son opciones de mitigación tecnológicas que convierten el exceso de CO₂ en un producto almacenado y de alto valor añadido, respectivamente (Nocito & Dibenedetto, 2020). La estrategia CCS se basa en el almacenamiento a largo plazo del CO₂ capturado a partir de fuentes de emisión importantes para evitar su emisión a la atmósfera, mientras que la estrategia CCU busca la transformación del CO₂ capturado a productos de alto valor, lo que incrementa el valor económico libre de emisiones (Daneshvar *et al.*, 2022).

La Captura de Aire Directa (CAD) desde la atmósfera, también es considerada una tecnología de separación que ha sido abordada desde la fotosíntesis mediante la obtención de CO₂ a partir de su captura por la introducción del aire hacia columnas depuradoras humedecidas con soluciones de hidróxido de sodio que, al reaccionar, producen una solución acuosa de hidróxido de sodio y carbonato de sodio (Koytsoumpa, *et al.*, 2018).

Sin embargo, se ha observado que el enfoque CCU empleando microalgas posee ventajas sobre las demás, tales como la simplicidad del proceso y un potencial para mejorar la relación costo-eficiencia, ya que la mayoría de las especies de microalgas demuestran un mejor crecimiento cuando la mayoría del carbono inorgánico se encuentra disponible en forma de iones de bicarbonato (HCO₃⁻) (Daneshvar *et al.*, 2022). Esta afinidad ocurre gracias a los mecanismos de concentración de carbono (CCM) que las microalgas han desarrollado a lo largo de su evolución, dichos mecanismos se clasifican en 3 vías principales; adquisición activa y directa de HCO₃⁻, transporte activo de CO₂ y a través de la anhidrasa carbónica externa a la membrana plasmática (Bachu, 2008). Por

este motivo se considera a las microalgas como una herramienta valiosa para evaluar la captura de dióxido de carbono mediante RuBisCO a través del enfoque CCU.

Un ejemplo de esto es el procedimiento híbrido desarrollado para la utilización de CO₂ y HCO₃⁻ en 2019 por Song *et al.* Utilizando aguas de desecho de soya como fuente de nutrientes para el crecimiento de *Chlorella sp.* y buffer para diluir CO₂ capturado a partir de un depurador de aminas, lo que resultó en un rendimiento de biomasa de 78.8 mg/L y con una eficiencia de conversión del carbono mayor al 60% (Song *et al.*, 2019).

Por otro lado, se han realizado esfuerzos para diseñar un sistema de reacción enzimática libre de células que permita la fijación de CO₂ mediante RuBisCO obtenida a partir de *Spinacia oleracea*. Sin embargo, este estudio sólo llegó hasta la etapa de inmovilización de la enzima en una matriz y su evaluación en reusabilidad de la enzima y relación temperatura-actividad. Cabe mencionar que la eficiencia de acoplamiento no fue evaluada. Diversos autores, tales como Chakrabarti *et al.*, concluyen que es necesario continuar con este tipo de investigaciones para lograr fijar CO₂ de forma exitosa (Chakrabarti *et al.*, 2003).

Es por lo anterior que, a través de este estudio, buscamos utilizar mecanismos enzimáticos a partir de los recursos biológicos disponibles y endógenos del estado de Nuevo León, para la potencial captura de CO₂. En este sentido, se pretende obtener una enzima RuBisCO proveniente de un microorganismo de Nuevo León, capaz de mediar la conversión de RuBP a 3-PGA durante procesos de fijación de CO₂ (carboxilación).

Con la finalidad de que este proyecto brinde las bases para contribuir en un futuro a la investigación enfocada a mitigar los altos niveles contaminación actual.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La enzima RuBisCO obtenida a partir de un microorganismo endógeno del estado de Nuevo León es capaz de mediar la conversión de RuBP a 3-PGA en una prueba *in-vitro* en presencia de HCO_3^- como fuente de carbono.

3.2 Objetivo General

Extraer una enzima RuBisCO de origen microbiano endógeno del estado de Nuevo León como base para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas.

3.2.1 Objetivos Específicos

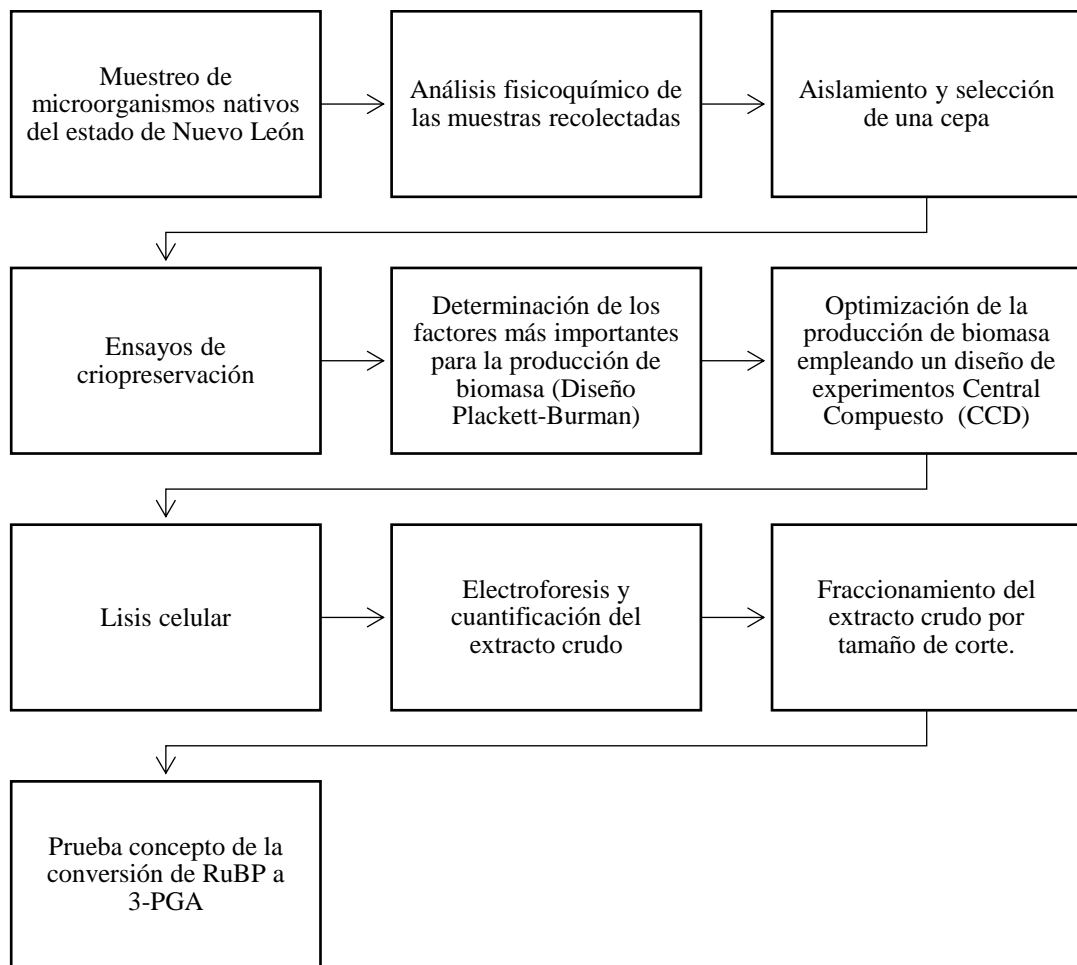
1. Muestrear microorganismos nativos fotosintéticos de diferentes cuerpos de agua del estado de Nuevo León.
2. Aislar y seleccionar un microorganismo fotosintético para la producción de RuBisCO.
3. Desarrollar un método de criopreservación específico para la microalga seleccionada.
4. Optimizar la producción de biomasa con el microorganismo seleccionado.

5. Separar y recuperar la fracción pesada del lisado citoplasmático para la obtención de la enzima RuBisCO de la cepa seleccionada.
6. Establecer las condiciones de reacción enzimática de la enzima RuBisCO.
7. Comparar las características de la enzima RuBisCO del microorganismo seleccionado contra una enzima comercial.
8. Realizar una prueba concepto para evaluar la factibilidad tecnológica a nivel de laboratorio de la conversión de RuBP a 3-PGA por acción de la RuBisCO.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia General Del Proyecto



4.2 Localización

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Procesos Microbiológicos y el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L.

4.3 Equipos y Reactivos

Tabla 1. Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Centrífuga refrigerada	Eppendorf	5430 R
Balanza analítica	Sartorius	ENTRIS224-LSU8
Agitador magnético	Corning	P6-420-D
Incubadora	Shell Lab Labtech	516 LS13016A
Campana de flujo laminar	Prendo	CFL 102 NW
Autoclave	Tuttnauer	2540MK
Espectrofotómetro	Varian Eppendorf	Cary 50 BioSpectrometer®
Microscopio	Zeizz	KF2
Ultrasonicador	Fisher Scientific	FB120
Refrigerador	Torrey	RS600 E20
Thermo mixer	Eppendorf	ThermoMixer C
Vórtex digital	Thermo Scientific	88882009
Equipo de electroforesis	Bio-Rad	Power Pac™ Universal
Agitador	DLab	SK-D1807-S
Temporizador digital	GE	SunSmart™ Digital Timer,
Emisor de calor	Nuodwelle	JRD0806
Controlador de termostato	Lojw	W1209
Sensor de temperatura	NTC	-
Fuente conmutada	Unit Electronics	S-24-2
Lámparas LED	Philips	Essential LED

Tabla 2. Reactivos

Reactivo	Marca
Agar bacteriológico	BD Bioxon
Agua desionizada	No aplica
Ácido cítrico	Desarrollo de especialidades químicas
Citrato de amonio hierro	Desarrollo de especialidades químicas
NaCl	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V
MgCl ₂	Desarrollo de especialidades químicas
KCl	Desarrollo de especialidades químicas
NaNO ₃	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V
K ₂ HPO ₄	J.T. Baker
KH ₂ PO ₄	CTR
MgSO ₄	CTR
HBO ₃	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V
MnCl ₂	J.T. Baker
EDTA	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V
ZnSO ₄	J.T. Baker
CuSO ₄	J.T. Baker
Na ₂ MoO ₄	Desarrollo de especialidades químicas
Co(NO ₃)	Desarrollo de especialidades químicas
CoCl ₂	J.T. Baker
ZnCl ₂	Control técnico y representaciones S.A. de C.V.
FeSO ₄	Desarrollo de especialidades químicas
H ₂ SO ₄	LeMont
H ₃ BO ₃	Desarrollo de especialidades químicas
Tris Buffer	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
CH ₃ OH	Baker

4.4 Tipo de estudio

El presente estudio es de alcance exploratorio mixto dado que busca abrir paso al conocimiento referente a la enzima RuBisCO en microorganismos fotosintéticos endógenos del estado de Nuevo León, dicha información no se encuentra disponible actualmente y representa una oportunidad para conocer las características y el potencial de aplicación de la biodiversidad con la que cuenta la Entidad.

4.5 Muestreo de Microorganismos Nativos Fotosintéticos del Estado de Nuevo León

Se realizó una búsqueda literaria sobre las especies de microalgas documentadas con mayor producción de biomasa y eficiencia de fijación de CO₂. De la lista obtenida se realizó una búsqueda en los registros de microalgas encontradas hasta la fecha en diversos cuerpos de agua de Nuevo León. A partir de esta información se eligieron los sitios para buscar y aislar estos microorganismos de interés para el presente proyecto (Figura 2)

Con base en lo anterior, los sitios de muestreo seleccionados fueron:

1. La Laguna, Higuera, N.L. (25°56'00.2"N 99°59'28.4"W)
2. Río Salinas, Marín, N.L (25°50'11.3"N 100°02'35.2"W)
3. Presa del Cerro Prieto, Linares, N.L. (24°55'17.8"N 99°27'26.8"W)
4. Río San Juan, General Bravo, N.L. (25°47'58.6"N 99°10'56.3"W)

Así mismo, fue de interés la toma de muestra de una charca temporal, ubicada en la Colonia Residencial Vidriera, Mty. N.L. ($25^{\circ}42'33.2''N$ $100^{\circ}18'04.0''W$), la cual presentaba un denso crecimiento de microalgas.

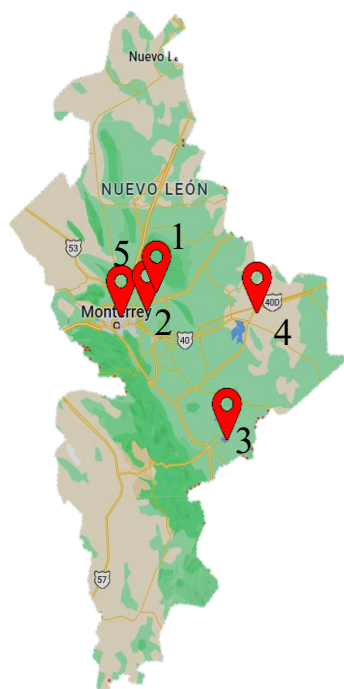


Figura 2. Mapa del estado de Nuevo León con las ubicaciones de los puntos de muestreo seleccionados (1) La Laguna, Higuera, N.L., (2) Río Salinas, Marín, N.L., (3) Presa del Cerro Prieto, Linares, N.L., (4) Río San Juan, General Bravo, N.L., (5) Colonia Residencial Vidriera, Mty. N.L.

4.5.1 Toma de Muestra

Se recolectaron muestras de agua representativas en contenedores de cierre hermético a partir de los distintos cuerpos de agua antes mencionados, todos ubicados en el estado de Nuevo León. Las muestras se mantuvieron en baño de hielo durante su transferencia al laboratorio, en donde se conservó a $4^{\circ}C$. Lo anterior se realizó de acuerdo con el procedimiento establecido para el muestreo en canales por la norma NMX-AA-003-1980 Aguas residuales – Muestreo.

Posteriormente, en el laboratorio, se inocularon 5 mL de la muestra original en 45 mL de medio BG-11 (Apéndice 1) en tubos Falcon de 50 mL y se incubaron con un fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad), a una intensidad de 1,310 lúmenes con agitación a 150 rpm y a 25 °C ± 2 (Lavens & Sorgeloos, 1996).

4.5.2 Análisis Físicoquímico

Las muestras de agua que presentaron mayor crecimiento y diversidad de microalgas fueron sometidas a un análisis físicoquímico a través del departamento de Servicios Profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas. Las pruebas realizadas y las normas en las que se basa la metodología utilizada se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Pruebas Incluidas en el Análisis Físicoquímico de las Muestras de Agua Seleccionadas

Determinación o compuesto	Metodología utilizada
Conductividad	NMX-AA-093-SFCI-2018
Dureza total	NMX-AA-072-SFCI-2001
Dureza de calcio	SM 3500 CaB-2012
Alcalinidad a la fenolftaleína	NMX-AA-036-SCFI-2001
Alcalinidad al naranja de metilo	NMX-AA-036-SCFI-2001
Cloruros	NMX-AA-073-SCFI-2001
Sulfatos	NMX-AA-074-1981
Color	NMX-AA-045-SCFI-2001
Turbidez	NMX-AA-038-SCFI-2001
pH	NMX-AA-008-SCFI-2016
DQO	NMX-AA-030-SCFI-2012
DBO	NMX-AA-028-SCFI-2001
Fosforo	AOAC-958.01
Nitrógeno total	NMX-AA-026-SCFI-2010
SAAM	NMX-AA-039-SCFI-2001

4.5.3 Registro Fotográfico

Se realizó un registro fotográfico de los microorganismos presentes en las muestras inoculadas al cabo de 14 días de incubación mediante microscopía óptica a 100x para su identificación a nivel de género y para descartar la presencia de contaminación (K. Lee *et al.*, 2014a).

4.6 Aislamiento y Selección de un Microorganismo Fotosintético para la Producción de RuBisCO

Para llevar a cabo el aislamiento de especies fotoautótrofas contenidas en las muestras recolectadas, se realizaron siembras en placas Petri en agar bacteriológico con medio BG-11 a partir de diluciones en serie a extinción inicial y siembra por extensión. Posteriormente se realizaron pases sucesivos hasta la obtención de colonias aisladas, dichas colonias fueron inoculadas en medio líquido BG-11 para la producción de biomasa y fueron incubadas con un fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad), a una intensidad de 1,310 lúmenes con agitación a 150 rpm y a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Lavens & Sorgeloos, 1996).

Una vez concluida la etapa de crecimiento de las microalgas, se realizó una identificación morfológica a nivel de género a partir de las cepas aisladas mediante microscopía óptica a 40x y 100x. De las cepas identificadas se evaluó el aumento de biomasa al cabo de 14 días de incubación, permitiendo determinar aquellas de más rápido crecimiento. Finalmente, de los microorganismos previamente seleccionados se realizó

una búsqueda documental para elegir la cepa con la mejor tasa de fijación de carbono y confirmar sus características de producción de biomasa.

4.7 Desarrollo de un Método de Criopreservación Específico para Microalgas Seleccionadas.

Con la finalidad de evaluar el mejor proceso de conservación de los microorganismos seleccionados, se realizó un ensayo cualitativo de la tolerancia de la microalga al agente crioprotector (ACP) y la concentración que permitiera la mejor recuperación de la viabilidad del microorganismo al ser reactivado después de ser criopreservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para lo anterior se preparó con anticipación un stock de CH_3OH al 20 % para liberar el calor producido por la reacción exotérmica al contacto con el agua antes de exponer a las microalgas al reactivo. Se inoculó la cepa en tubos de 15 mL con una concentración final de CH_3OH al 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % y se incubó por 2 horas en oscuridad. Estos tubos se centrifugaron por 4 minutos a 7,800 rpm para retirar el ACP y la biomasa fue inoculada en medio BG-11 para ser incubada por 7 días a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ en fotoperiodos de 24:0 para evaluar su crecimiento.

Considerando el crecimiento observado, se seleccionó la concentración mayor de ACP a la que se conservó la viabilidad y no retrasó el crecimiento del microorganismo, para posteriormente ser conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de 1.5 mL. Así mismo, se evaluó la cepa en condiciones de congelación con otro ACP, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ al 30 %, y con agua destilada, como controles. Al cabo de 7 días se descongelaron los tubos y se inocularon en medio de

cultivo, en donde se incubaron por 4 días en medio BG-11 para observar la viabilidad del microorganismo con cada ACP al ser reactivado (Andersen, 2005).

4.8 Optimización de Producción de Biomasa de la Microalga Seleccionada

4.8.1 Identificación de Factores Relevantes con un Diseño Plackett-Burman

Con el objetivo de identificar a los factores que son más importantes para optimizar la producción de biomasa de la cepa seleccionada, se realizó un diseño Plackett-Burman mediante el programa Design Expert 13.0.5.0 considerando como factores de prueba la temperatura, fotoperiodo, intensidad de luz, agitación, pH, medio y tipo de contenedor (Ver Tabla 4 y 5). Se tomó como respuesta el crecimiento, medido como el número de células por mililitro, considerando las células incluidas en el inóculo. Este número es obtenido por microscopía óptica mediante cuenta en cámara de Neubauer Improved Marienfeld® de 0.100 mm de profundidad y 0.0025mm² de superficie.

Tabla 4. Factores y Niveles a Evaluar Mediante un Diseño Plackett-Burman.

Factor	Nombre	Unidad	Tipo	Mínimo	Máximo
A	Temperatura	°C	Numérico	23.00	33.00
B	Fotoperiodo	Horas	Numérico	8.00	24.00
C	Intensidad de luz	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Numérico	60.00	200.00
D	Agitación	-	Categorico	Sin	Con
E	pH	-	Numérico	7.00	9.00
F	Medio	-	Categorico	BBM	BG11
G	Contenedor	-	Categorico	Tubo	Matraz

Tabla 5. Diseño Plackett-Burman.

Corrida	Temperatura	Fotoperiodo (Luz:oscuridad)	Intensidad	Agitación	pH	Medio	Contenedor
1	33	8:16	200	Con	7	BG11	Matraz
2	23	24:0	200	Con	7	BBM	Tubo
3	33	8:16	60	Sin	9	BBM	Matraz
4	33	24:0	200	Sin	7	BBM	Matraz
5	23	8:16	60	Sin	7	BBM	Tubo
6	23	24:0	200	Sin	9	BG11	Matraz
7	33	24:0	60	Sin	7	BG11	Tubo
8	23	8:16	60	Con	7	BG11	Matraz
9	23	8:16	200	Sin	9	BG11	Tubo
10	23	24:0	60	Con	9	BBM	Matraz
11	33	24:0	60	Con	9	BG11	Tubo
12	33	8:16	200	Con	9	BBM	Tubo

4.8.2 Estudio de Optimización Basado en un Diseño Central Compuesto (CCD)

Considerando los resultados obtenidos con el Diseño exploratorio Plackett-Burman se establecieron los tres factores más relevantes para la producción de biomasa (Tabla 5) que fueron utilizados para la optimización del proceso mediante un Diseño Central Compuesto, este tipo de diseños permiten reducir el número de experimentos a realizar y considerar los efectos de las interacciones entre variables (Ranade & Thiagarajan, 2017).

El Diseño Central Compuesto Circunscrito fue seleccionado ya que es particularmente útil al realizar experimentos secuenciales debido a que explora el espacio más grande del proceso con un número mínimo de experimentos (Wagner *et al.*, 2014), este diseño consta de un diseño factorial con un nivel bajo y un nivel alto, un diseño adicional con puntos axiales y puntos centrales, de manera que todos los factores son evaluados en 5 puntos ($-\alpha$, -1 , -0 , $+1$, $+\alpha$) (Cabrera, 2014), a diferencia del Diseño Central Compuesto Centrado por Caras, el Diseño Central Compuesto Inscrito y el Diseño Box-

Behnken, cuyos espacios experimentales se encuentran dentro de los límites de cada nivel (Ranade & Thiagarajan, 2017). El diseño realizado para este estudio contiene 3 factores numéricos (ver Tabla 6), alfa igual a 1.68179 y 20 corridas que consisten en distintas combinaciones de cada uno de los niveles establecidos para cada factor, incluyendo 6 puntos centrales (ver Tabla 7), este diseño fue realizado mediante Design Expert.

Tabla 6. Factores más Relevantes para la Optimización de Producción de Biomasa a Escala Laboratorio

Factor	Nombre	Unidad	Tipo	Punto axial - α	Punto axial + α	Punto factorial bajo	Punto factorial alto	Punto central
A	Temperatura	°C	Numérico	26.59	43.41	-1 = 30	+1 = 40	35.00
B	Fotoperiodo	Horas	Numérico	8.95	24.00	-1 = 12	+1 = 20.95	16.47
C	Intensidad de luz	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Numérico	90.46	729.54	-1 = 220	+1 = 600	410.00

Tabla 7. Diseño Central Compuesto

Corrida	Temperatura	Fotoperiodo	Intensidad de luz
1	43.409	16.4746	410
2	35	24	410
3	40	20.9492	600
4	35	16.4746	410
5	35	16.4746	410
6	35	16.4746	410
7	35	16.4746	410
8	35	16.4746	90.4594
9	35	16.4746	410
10	35	16.4746	410
11	30	20.9492	600
12	30	12	220
13	35	16.4746	729.541
14	30	12	600
15	35	8.94925	410
16	30	20.9492	220
17	40	12	220
18	40	12	600
19	26.591	16.4746	410
20	40	20.9492	220

Finalmente, los resultados obtenidos a partir del CCD fueron analizados por la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) empleando el programa Design Expert para obtener las gráficas que ilustran los valores óptimos para la producción de biomasa de la cepa seleccionada.

Como paso final del análisis de este modelo, se realizó una prueba confirmatoria con las condiciones óptimas arrojadas del diseño.

4.9 Separación y Recuperación de la Fracción Pesada del Lisado Citoplasmático para la Obtención de la Enzima RuBisCO de la Cepa Seleccionada

Se llevó a cabo la producción de biomasa a partir de la cepa candidata durante un total de 45 días. Para ello se realizaron cambios parciales de medio de cultivo cada 14 días y a partir del último cultivo se realizaron los siguientes procedimientos.

4.9.1 Lisis Celular

Se tomaron 5 mL de biomasa y se mezclaron con 10 mL de buffer Tris-HCl 50 mM a pH 8 en un tubo Falcon de 50 mL, las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación por 5 minutos a 7,800 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 mL de buffer Tris-HCl. La muestra fue lisada en un ultrasonicador a 4 °C en ciclos de 5 minutos, compuestos por pulsos de 30 segundos y descansos de 59 segundos. Al cabo de 5 ciclos, la muestra fue centrifugada por 15 minutos a 7,800 rpm y 4 °C, se recuperó el sobrenadante que consistía en el extracto crudo con proteínas. Este

extracto fue congelado por 24 horas para romper cualquier resto celular restante. Al cabo de este tiempo el extracto fue descongelado y centrifugado nuevamente por 15 minutos a 7,800 rpm, a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante clarificado, el cual posteriormente fue alicuotado en tubos de 1.5 mL y almacenado a -20 °C para su análisis posterior.

4.9.2 Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la recolección de una muestra de 3 µL del extracto crudo que fue colocada en una celda de 1 mm para su análisis en un equipo Eppendorf BioSpectrometer[®] con el método de rutina “Proteins direct UV”, el cual se fundamenta en una medición a 280 nm y su evaluación por un factor definido para la conversión del valor de absorbancia a concentración (Eppendorf, 2019), este factor se encuentra preprogramado en el equipo y, de acuerdo con el fabricante, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$F_p = \frac{1}{a_{0.1\%}} \quad (1)$$

En donde:

F_p = factor (g/L)

$A_{0.1\%}$ = absorbancia de la proteína a 0.1% (1 g/L)

Este último valor es obtenido a partir de la siguiente fórmula:

$$A_{0.1\%} = \frac{\epsilon_p}{MM_p} \quad (2)$$

En donde:

ϵ_p = coeficiente de absorbanza molar de la proteína ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

MM_p = masa molar relativa de la proteína (Da)

4.9.3 Prueba de Electroforesis SDS-PAGE

Con la finalidad de establecer el perfil proteico de la muestra, se cargaron 10 μL del extracto crudo (obtenido del lisado de la biomasa) en un gel de electroforesis SDS-PAGE en poliacrilamida al 15 %, bajo condiciones de 80/120 V, seguido de su tinción con Azul de Coomassie. En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular Sigma MarkerTM – Wide range 6.5 kDa – 200 kDa y el segundo carril fue designado para la muestra.

4.9.4 Fraccionamiento por Tamaño de Corte

El fraccionamiento se realizó de acuerdo con el trabajo reportado por Kato *et al.* Para lo cual se colocaron 15 mL del extracto crudo en un centrifón Spin-X[®] UF 20 de 100 MWCO y se centrifugó a 6,000 g por periodos de 15 minutos hasta concentrar la muestra a un volumen retenido de 750 μL (Kato *et al.*, 2021). Posteriormente, el volumen filtrado fue descartado mientras que, el volumen retenido se almacenó para evaluar la presencia

de la enzima RuBisCO, con un tamaño esperado de alrededor de 560 kDa (Teuling et al., 2019).

4.10 Condiciones de Reacción de la Enzima RuBisCO

Las condiciones de reacción para la enzima RuBisCO fueron adaptadas de acuerdo con el estudio reportado por Lilley *et al.* La reacción enzimática consistió en la preparación de una mezcla de reacción de volumen final de 1.4 mL, compuesto por buffer de activación (ajustado a pH 8.1) que contenía Tris-HCl a 25 mM, 0.1mM EDTA, 3 mM MnCl₂, 0.6 mM NaHCO₃. Como sustrato de la enzima se empleó la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) a una concentración de 0.7 mM (Lilley *et al.*, 2010). Para iniciar la reacción, se adicionan a la mezcla de reacción 0.6 mL de la fracción con la enzima (obtenida por centrifugación y descrita en el procedimiento anterior), hasta llegar a una concentración final de 0.05 mg/mL de proteína total en el volumen final de la reacción (2 mL).

4.11 Comparación de la Enzima RuBisCO del Microorganismo Seleccionado Contra una Enzima Comercial

Las condiciones de reacción previamente descritas fueron implementadas para la reacción enzimática con una enzima comercial marca Sigma R8000-5UN, con peso molecular de 557 kDa y de estructura hexadecamérica compuesta por 8 subunidades grandes (56 kDa) y 8 subunidades pequeñas (14 kDa). Esta enzima proviene del organismo *Spinacia oleracea*. Para la prueba se preparó una solución stock de 5 mg/mL,

disolviendo la enzima liofilizada en buffer de activación (25 mM buffer Tris-HCl ajustado a pH 8.1, 0.1 mM EDTA, 3mM MnCl₂, 0.6 mM NaHCO₃) y conservado a 4 °C (Lilley *et al.*, 2010). De la solución stock se tomó el volumen necesario para diluir la enzima a una concentración final de 0.05 mg/mL en la mezcla de reacción (volumen total de 2 mL), la cual se realizó bajo las mismas condiciones descritas en la sección anterior.

4.12 Prueba Concepto para Evaluar la Conversión de RuBP a 3-PGA por Acción de la Enzima RuBisCO y la Factibilidad Tecnológica de su Obtención a Nivel de Laboratorio

La evaluación de la conversión del sustrato RuBP catalizada por la actividad de la enzima RuBisCO fue monitoreada de acuerdo con el método propuesto por (Jakob & Saenger, 1985), en dónde se describe un método de análisis cualitativo para monitorear la reacción en tiempo real. Para el estudio se realizaron barridos de la mezcla de reacción y sus respectivos controles, en un rango de 200 - 800 nm empleando un espectrofotómetro Cary 50. La solución fue monitoreada cada 30 min hasta alcanzar un tiempo de reacción de 1.5 horas, obteniendo distintos perfiles en los espectros de absorción UV-Vis registrados por el equipo. Durante el análisis se buscó la aparición del pico de absorción del 3-PGA, el cual aparece a los 220 nm y es el producto principal de la reacción enzimática catalizada por la RuBisCO. Cabe mencionar que todas las mediciones de las muestras (y sus réplicas) se llevaron a cabo en una celda de cuarzo para disminuir la interferencia en el límite más bajo del espectro.

Además, con la finalidad de buscar la implementación real de los conocimientos generados en el proyecto, este estudio concluyó con el desarrollo de un prototipo para la producción de biomasa y obtención de la enzima RuBisCO, el cual pudiera ser empleado en espacios no necesariamente especializados para trabajar con técnicas de microbiología.

Este prototipo consistió en el diseño de un fotobiorreactor conformado por una caja de madera con las siguientes medidas: largo 40 cm, ancho 30 cm, alto 25 cm.

Con la finalidad de mantener la temperatura estable en el interior se colocaron paneles de unicel cubriendo toda la superficie interna como material aislante. La tapa fue colocada con un espacio de 2 centímetros por encima del borde de la caja, para permitir la ventilación y evitar el sobrecalentamiento al interior. En la tapa se insertaron los sockets necesarios para conectar la iluminación y permitir que los cables permanecieran por fuera de la caja. Se colocó una tira de papel de 8 cm de ancho alrededor de la tapa para evitar la interferencia de luz exterior, sin obstruir la ventilación.

La fuente de calor consistió en un emisor de cerámica de 100 W marca Nuodwelle modelo JRD0806 que fue insertado en un socket atornillado a la base de la caja, este socket fue conectado a un controlador digital de termostato de 12 V marca Lojw modelo W1209 con un sensor de temperatura NTC colocado al interior de la caja. El rango de control de este dispositivo se encuentra entre $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tiene una resolución de $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre los $\sim 9.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $99.9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este controlador cuenta con 8 parámetros de ajuste, para los fines requeridos en el presente proyecto se configuraron 4 de ellos: temperatura de encendido, modalidad (calor/frío), histéresis y corrección de temperatura, los demás parámetros se mantuvieron en su configuración por defecto. El controlador de temperatura fue conectado

a una fuente conmutada Unit Electronics modelo S-24-2 para la conversión de corriente de 110 V a 12 V.

La iluminación consistió en un set de lámparas LED de la marca Philips (modelo Essential LED, de luz fría, con una temperatura de color de 6500 K), el consumo y flujo luminoso fue establecido de acuerdo con los requerimientos específicos del ensayo a realizar. Para configurar los fotoperiodos la iluminación se conectó a un temporizador digital programable marca GE, modelo SunSmart™ Digital Timer, configurado con un tiempo de encendido y apagado diario de acuerdo con el fotoperiodo requerido para el ensayo.

Finalmente, la prueba confirmatoria realizada como paso final en la optimización fue llevada a cabo en este prototipo para observar si los resultados obtenidos en la producción de biomasa (bajo las condiciones optimizadas establecidas durante el estudio) son equiparables a los registrados usando una incubadora comercial (adaptada como fotobiorreactor) bajo los mismos parámetros.

4.13 Disposición de Residuos

Los residuos generados durante el proceso de este proyecto de investigación se dispondrán de acuerdo con las características de estos. El Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas se asegurará de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos de acuerdo con los procedimientos para la clasificación de residuos peligrosos, formato PR-CLB-SRR/000.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





5.1 Muestreo de Microorganismos Nativos Fotosintéticos del Estado de Nuevo León

5.1.1 Selección de Sitios de Muestreo

Hasta 2022 se han reportado cepas pertenecientes a los filos Chlorophyta y Ochrophyta como las mayores y más estables productoras de biomasa en el largo plazo, algunos ejemplos son especies pertenecientes a los géneros *Chlorella*, *Picochlorum*, *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Nanochloropsis*, *Cyclotella*, *Chaetoceros*, *Desmodesmus*, *Anabaena* y *Botryococcus* (Subramanian & Sayre, 2022).

Al cotejar esta información con el registro de microalgas de Nuevo León (Aguirre-Cavazos *et al.*, 2018) se eligieron las zonas en las que podrían ser encontradas estas microalgas de interés. A partir de dicha información, se determinó que los cuerpos de agua más relevantes para este propósito serían los pertenecientes a la Subcuenca del Río San Juan (conformada por siete afluentes: río San Juan, río Pesquería, río Salinas, río San Miguel, río Santa Catarina, río Ramos y río Pílon) y la Cuenca del río San Fernando (conformada por río Camarones, río Camacho, río Potosí, río Pablillo, presa del Cerro Prieto, entre otros). De tal forma que se eligieron los sitios de muestreo plasmados en la Tabla 8.

Tabla 8. Fotografías de los Sitios de Muestreo

Sitio	Fotografía
<p>1. La Laguna, Higueras, N.L. 25°56'00.2"N 99°59'28.4"W</p>	
<p>2. Río Salinas, Marín, N.L. 25°50'11.3"N 100°02'35.2"W</p>	
<p>3. Presa del Cerro Prieto, Linares, N.L. 24°55'17.8"N 99°27'26.8"W</p>	
<p>4. Río San Juan, General Bravo, N.L. 25°47'58.6"N 99°10'56.3"W</p>	

5. Charca
temporal, Colonia
Residencial
Vidriera, Mty.
N.L.
25°42'33.2"N
100°18'04.0"W



5.1.2 Registro Fotográfico

A partir de las muestras obtenidas, se pudieron observar las siguientes morfologías macroscópicas en los tubos en donde se encontraban los inóculos de cada sitio (Ver Figura 3). Destacando estructuras filamentosas con aglomeramientos en las muestras obtenidas a partir de ríos, como las que se observan en la Figura 3B y D, a diferencia de aquellas recolectadas en sitios con menor corriente de agua, como lagunas, presas o charcas, visibles en la Figura 3A, C y E, que presentan crecimiento particulado. Esta diversidad de estructuras es atribuible a la habilidad que poseen las microalgas para cambiar su morfología con la finalidad de adaptarse a distintas condiciones ambientales (Darienko *et al.*, 2015).

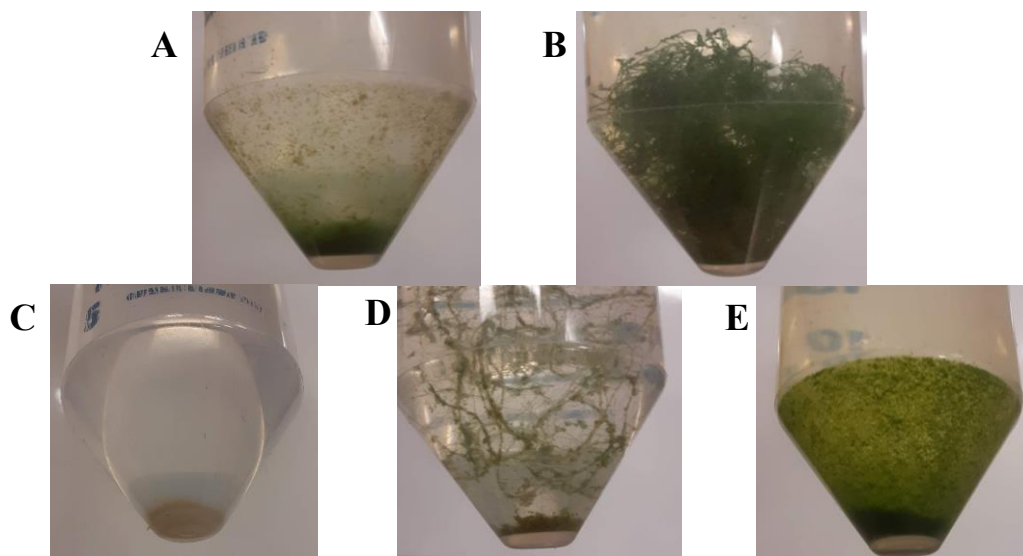
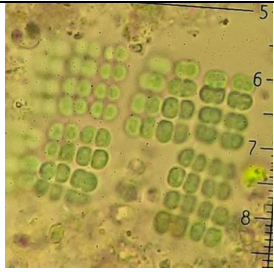


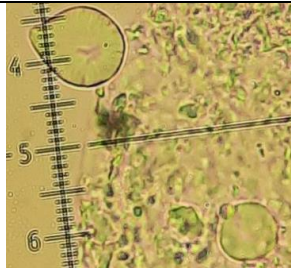



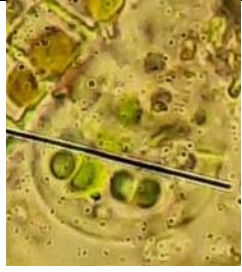




Figura 3. Morfología macroscópica en los tubos con medio BG-11 inoculados con las muestras recolectadas. (A) La Laguna, Higueras, N.L., (B) Río Salinas, Marín, N.L, (C) Presa del Cerro Prieto, Linares, N.L., (D) Río San Juan, General Bravo, N.L, (E) Colonia Residencial Vidriera, Mty. N.L.

Las fotografías de los microorganismos provenientes de cada inóculo observados a un aumento de 100x, así como una posible identificación a nivel de género de acuerdo con su morfología se presentan en la Tabla 9.

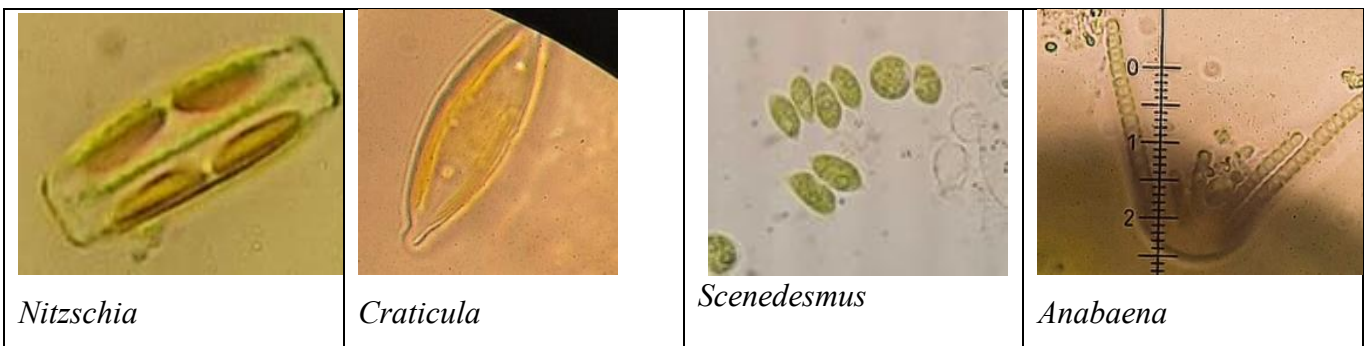
Tabla 9. Microorganismos Encontrados en la Muestra del Sitio 1.

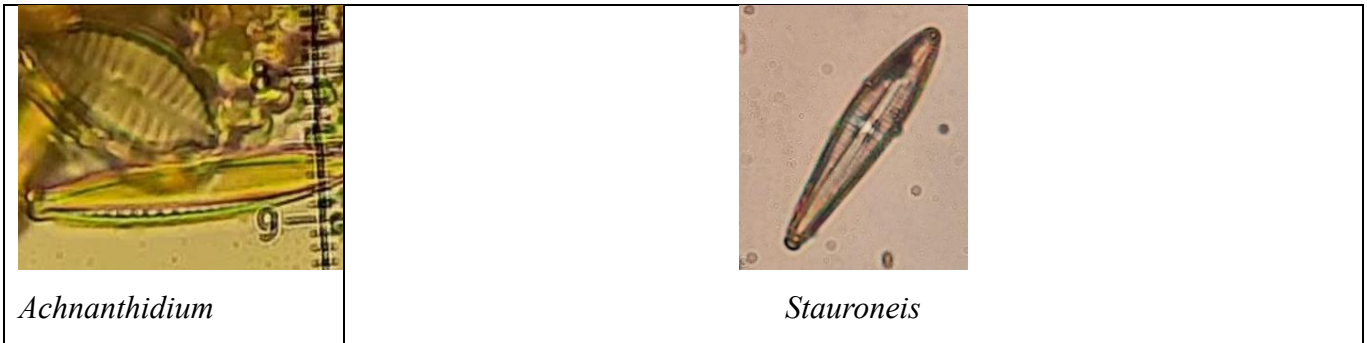
			
<p><i>Merismopedia</i></p>	<p><i>Scenedesmus</i> / <i>Desmodesmus</i></p>	<p><i>Selenastrum</i></p>	<p><i>Micrasterias</i></p>
			
<p><i>Nitzschia</i></p>	<p><i>Coelastrum</i></p>	<p><i>Trachelomonas</i></p>	<p><i>Eudorina</i></p>
			
<p><i>Chlamydomonas</i> y <i>Quadrigula lacustris</i></p>	<p><i>Anabaena</i></p>		

Se realizó una identificación de acuerdo con la morfología observada, algunos de los géneros encontrados en la muestra son: *Merismopedia*, cuyas células están ubicadas

en arreglos de múltiplos de cuatro, en una sola capa con filas perpendiculares, suelen encontrarse en aguas dulces y marinas (Van Vuuren, 2006). Por otro lado, *Micrasterias*, cuyas células son planas y circulares u ovaladas, tienen la apariencia de discos aplanados u estrellados, la pared celular es lisa y se componen de dos semi-células unidas con múltiples incisiones, cada una contiene un cloroplasto (Van Vuuren, 2006). Las células pertenecientes al género *Coelastrum* presentan formas esféricas o elipsoidales, en cenobios, pared celular lisa o rugosa y no poseen mucílago (Krienitz & Bock, 2012). Las células que pertenecen al género *Nitzschia* son elípticas, poseen 2 cloroplastos grandes y el rafe se encuentra en la orilla (Van Vuuren, 2006). En la muestra 2 (Tabla 10) pueden identificarse algunos microorganismos como: diatomea del género *Craticula*, de forma elíptica, extremos en forma de “cabeza” y los bordes de las valvas están ligeramente onduladas, así como un área central pequeña o ausente y 2 gotas de lípidos, uno a cada lado del puente citoplásmico

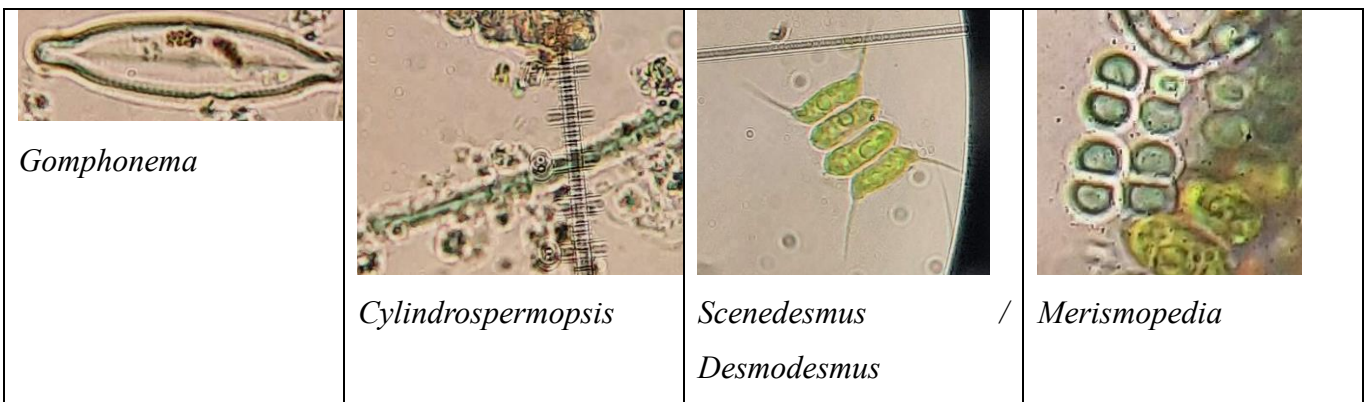
Tabla 10. Microorganismos Encontrados en la Muestra del Sitio 2

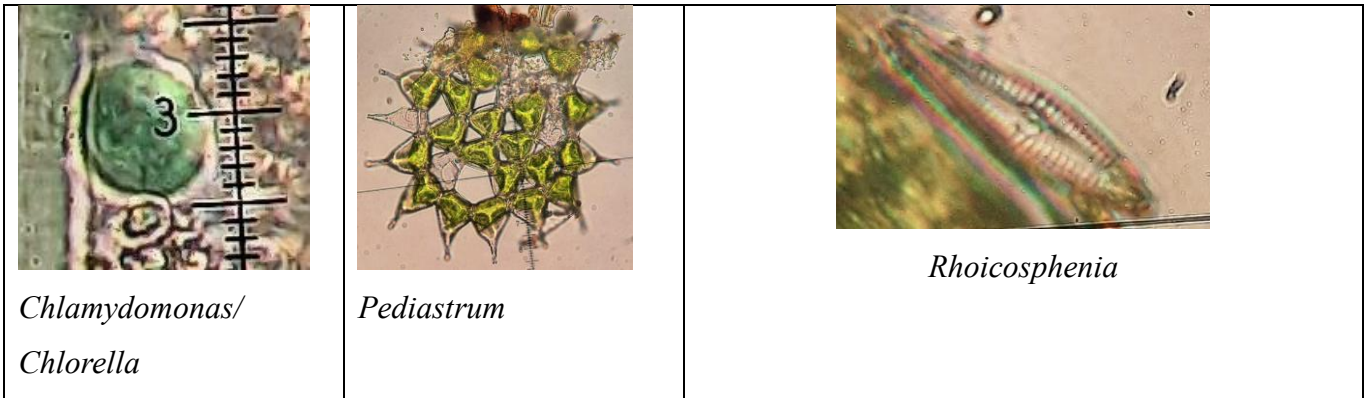




También podemos observar a la diatomea del género *Achnantheidium* por su forma corta y ancha, su circunferencia no es ancha y la estría se extiende hasta la orilla de la valva (Van Vuuren, 2006). Mientras que, en la muestra del sitio 4 podemos encontrar a la diatomea del género *Gomphonema*, este es un género muy común, se caracteriza por tener ápices en forma de “cabeza” y una ligera curvatura en uno de ellos, son variables en tamaño y se encuentran de forma típica adheridos en ríos y lagos (Nukurangi, 2017).

Tabla 11. Microorganismos Encontrados en la Muestra del Sitio 4





También se encuentra *Cylindrospermopsis*, sus células son cilíndricas y muy pequeñas, de color verde-azul. Las células de *Cylindrospermopsis* son capaces de fijar nitrógeno del aire, por lo tanto, no dependen del nitrógeno en el agua para sobrevivir, se encuentran comúnmente en lagos, estanques y ríos (Van Vuuren, 2006). *Pediastrum* posee formas características que se presentan en colonias de 4 a 64 células, el interior suele ser poliédrico con 4 o más lados. Se encuentra ampliamente distribuido en lagos, pantanos, estanques, y aguas dulces de flujo lento (Van Vuuren, 2006). Finalmente, *Rhoicosphenia*, la cual se caracteriza por tener un pseudoseptum en los polos de las valvas, así como poseer forma asimétrica. Finalmente, en la muestra del sitio 5, se observan células de *Neodesmus*, las cuales suelen presentarse en espiga, en forma de gota y formadas por cenobios compuestos de 2 células cada uno, conectados entre sí (Krienitz & Bock, 2012). El segundo microorganismo encontrado en esta muestra es *Chlorella*, que consiste en células pequeñas, inmóviles, raramente se encuentran agregadas, son esféricas con un solo cloroplasto, pared celular delgada y puede o no contener un pirenoide (Van Vuuren, 2006).

Tabla 12. Microorganismos Encontrados en la Muestra del Sitio 5



La identificación y clasificación taxonómica de las microalgas se ha realizado considerando sus características morfológicas y citológicas en sus etapas vegetativas, sin embargo, siempre ha sido una tarea compleja (Darienko *et al.*, 2015). Lo anterior se debe a que hay una cantidad de características morfológicas por reconocer, además de la existencia de plasticidad fenotípica, lo que lleva a interpretaciones inexactas o erróneas (Sehgal *et al.*, 2019). Es por este motivo que la identificación a nivel de género de los microorganismos encontrados en las muestras tomadas para este proyecto se presenta como una propuesta, sin embargo, sería necesario el uso de herramientas moleculares como la identificación genética de sitios como 18S, ADNr e ITS para confirmar la identidad de estos microorganismos (Sehgal *et al.*, 2019).

5.2 Aislamiento y Selección de un Microorganismo Fotosintético para la Producción de RuBisCO

Considerando el crecimiento y la observación de las características morfológicas de microalgas obtenidas de la etapa anterior, se realizó la caracterización de las muestras de aguas a partir de un análisis fisicoquímico. Las muestras elegidas fueron aquellas provenientes de los sitios M1, M2 y M5.

A partir de la muestra M1, proveniente de La Laguna, Higueras se aisló un consorcio de candidatas a *Closterium* y *Selenastrum* (Figura 4) pertenecientes al Filo Chlorophyta (Le *et al.*, 2019).

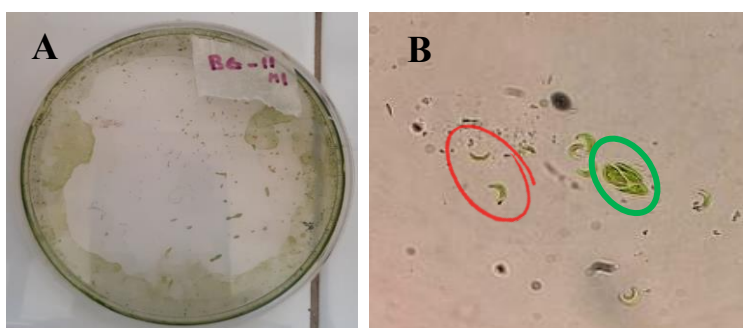


Figura 4. Morfología en aislamiento a partir de la Muestra 1 (A) Morfología macroscópica en placa petri. (B) Morfología microscópica (100x), en rojo se señala a *Selenastrum* y en verde a *Closterium*

Se describe a *Selenastrum* como un microorganismo irregular en forma de luna creciente, sin envoltura (Sehgal *et al.*, 2019) que crece en aguas con cantidades de fósforo desde 60 $\mu\text{g/L}$ en aguas residuales (Ferris *et al.*, 1974), lo cual concuerda con lo obtenido en las propiedades fisicoquímicas de esta muestra de agua (Ver Tabla 12). Además, cabe

mencionar que entre algunos de los requerimientos nutrimentales que han sido identificado para el crecimiento de *Selenastrum* estan: cloruros 12.2 mg/L, sulfatos 14.7 mg/L, nitrógeno 4.2 mg/L (Epa & of Science, 2002), siendo estas concentraciones cubiertas por los nutrientes contenidos en la muestra de agua evaluada, lo que la hace un ambiente ideal para el crecimiento de este microorganismo.

Los organismos pertenecientes a *Micrasterias*, que fue encontrada en esta muestra suelen encontrarse en aguas dulces con un pH neutro o ligeramente ácido, así como en lagos pobres en nutrientes (Van Vuuren, 2006), esto es congruente con el pH 6.97 al que se encuentra la muestra analizada.

Tabla 13. Resultados del Análisis Fisicoquímico Realizado a la Muestra M1

Determinación o compuesto	Valor obtenido	Límite máximo permisible (NOM-001-SEMARNAT-2021)
Conductividad ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	537	250
Dureza total (mg/L CaCO_3)	300	500
Dureza de calcio (mg/L CaCO_3)	230	300
Alcalinidad a la fenolftaleína (mg CaCO_3/L)	< 6	400
Alcalinidad al naranja de metilo (mg CaCO_3/L)	141	400
Cloruros (mg/L)	49.6	250
Sulfatos (mg/L)	135	400
Color (u.c. Pt-Co)	-	150
Turbidez (UNT)	124	5
pH (unidades de pH)	6.97	6-9
DQO (mg/L)	266	210
DBO (mg/L)	120	60
Fosforo (mg/L)	0.2	21
Nitrógeno total (mg/L)	12.8	35
SAAM (mg/L)	< 1	0.5

Mientras que de la muestra M2, proveniente de Río Salinas, Marín, N.L se aislaron microorganismos candidatos a *Scenedesmus* y *Chlorella* (Figura 5).

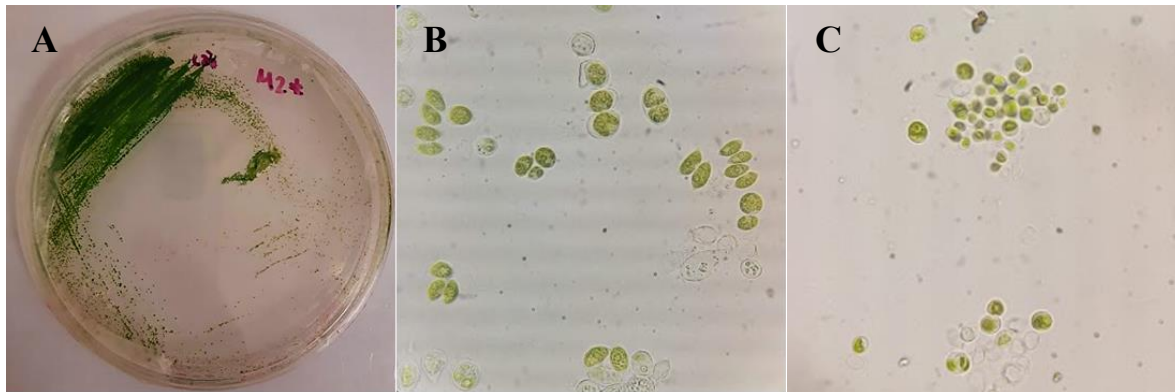


Figura 5. Morfología en aislamiento a partir de la Muestra 2 (A) Morfología macroscópica en placa petri. (B) Morfología microscópica (100x) candidata a *Scenedesmus* (C) Morfología microscópica (100x) candidata a *Chlorella*.

En dicha muestra se observan células candidatas al género *Chlorella*, de forma esférica u ovalada, que cuentan con un solo pirenoide, una vacuola grande y un cloroplasto. *Chlorella* es altamente adaptable a distintas condiciones, como ambientes eutróficos (Jiménez-Veuthey *et al.*, 2018).

Las células candidatas a *Scenedesmus* son ovaladas, delgadas en sus extremos, suelen presentarse en grupos de 4, sin embargo estas células poseen alta variabilidad morfológica que es atribuible a su estricta reproducción asexual por autoesporas. Este género está ampliamente distribuido en aguas dulces, en todos los climas, en aguas ligeramente ácidas y de salinidad baja. Además, es un bio indicador de cambios físicos y químicos en su ambiente (Krienitz & Bock, 2012).

En la Tabla 14 podemos observar una conductividad de 969 $\mu\text{S}/\text{cm}$, la cual se encuentra en el rango de la conductividad reportada en sitios a partir de los que se han aislado cepas de *Scenedesmus* con conductividad desde 195.3 hasta 2038 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Akgül *et al.*, 2017). Además, en un estudio llevado a cabo con agua de desecho de curtidurías se

observó su capacidad de remoción de compuestos como fosfatos (13.23 a < 2 mg/L), sulfatos (27.33 a < 2 mg /L), nitratos (44.6 a < 0.4 mg/L), nitritos (187 a < 2 mg/L) y DBO (17,363 a 2,085 mg/L), entre otros, lo cual ha demostrado que *Scenedesmus* es adaptable y capaz de crecer en ambientes altamente contaminados (Ballen *et al.*, 2016).

Tabla 14. Resultados del Análisis Fisicoquímico Realizado a la Muestra M2

Determinación o compuesto	Valor obtenido	Límite máximo permisible (NOM-001-SEMARNAT-2021)
Conductividad (µS/cm)	969	250
Dureza total (mg/L CaCO ₃)	400	500
Dureza de calcio (mg/L CaCO ₃)	270	300
Alcalinidad a la fenolftaleína (mg CaCO ₃ /L)	< 6	400
Alcalinidad al naranja de metilo (mg CaCO ₃ /L)	126	400
Cloruros (mg/L)	142	250
Sulfatos (mg/L)	262	400
Color (u.c. Pt-Co)	N.A.	150
Turbidez (UNT)	48	5
pH (unidades de pH)	6.86	6-9
DQO (mg/L)	60	210
DBO (mg/L)	32	60
Fosforo (mg/L)	0.21	21
Nitrógeno total (mg/L)	6.4	35
SAAM (mg/L)	< 1	0.5

A partir de la muestra M5, proveniente de Colonia Residencial Vidriera, Monterrey se aislaron microorganismos candidatos a *Chlorella*, (Figura 6) este microorganismo es capaz de adaptarse y remover nutrientes, contaminantes emergentes y patógenos (Silaen *et al.*, 2022). En un estudio de tratamiento de aguas residuales de una planta de tofu, se demostró que *Chlorella* es capaz de degradar nitrógeno total y fosfatos, lo que la hace fácilmente cultivable en aguas residuales (Ajijah *et al.*, 2020).

También se ha evaluado su comportamiento en aguas negras, en condiciones de 93 mg/L DQO, 6.2 mg/L nitrógeno amoniacal, 82 Pt Co (Unidades de color Platino - Cobalto), 12.8 mg/L fósforo y pH 7.45. Removiendo 84 % DQO, 95 % nitrógeno

amoniaco y 97 % fósforo (Alazaiza *et al.*, 2023). De acuerdo con el análisis fisicoquímico (Ver Tabla 15) el agua de donde fue aislado este microorganismo presenta valores de contaminantes menores a los utilizados en el estudio antes mencionado (con excepción de DQO), la capacidad de este microorganismo de prosperar en este tipo de medios permite utilizarla como herramienta de amplio potencial para la biorremediación (Silaen *et al.*, 2022).

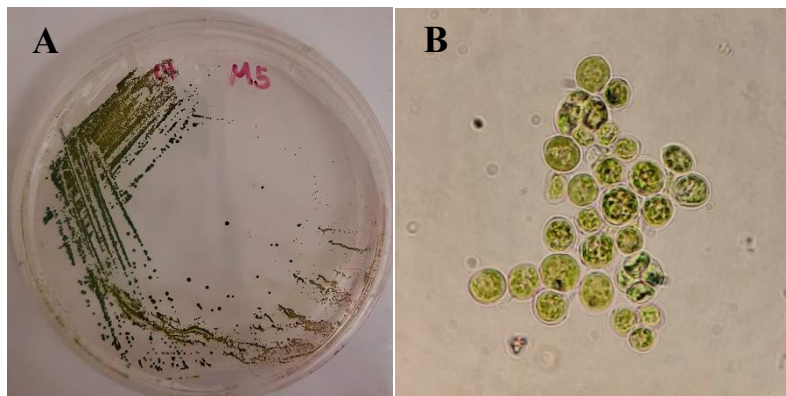


Figura 6: Morfología en aislamiento a partir de la Muestra 5 (A) Morfología macroscópica en placa petri por siembra en estría. (B) Morfología microscópica (100x).

Tabla 15. Resultados del Análisis Fisicoquímico Realizado a la Muestra M5

Determinación o compuesto	Valor obtenido	Límite máximo permisible (NOM-001-SEMARNAT-2021)
Conductividad ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	305	250
Dureza total ($\text{mg}/\text{L CaCO}_3$)	144	500
Dureza de calcio ($\text{mg}/\text{L CaCO}_3$)	112	300
Alcalinidad a la fenolftaleína ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	< 6	400
Alcalinidad al naranja de metilo ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	126	400
Cloruros (mg/L)	56.7	250
Sulfatos (mg/L)	31	400
Color (u.c. Pt-Co)	50	150
Turbidez (UNT)	N.A.	5
pH (unidades de pH)	7.01	6-9
DQO (mg/L)	139	210
DBO (mg/L)	55	60
Fosforo (mg/L)	0.34	21
Nitrógeno total (mg/L)	5.32	35
SAAM (mg/L)	< 1	0.5

Finalmente, de las microalgas obtenidas se seleccionó al género *Chlorella*, obtenida del sitio de muestreo 5 (Colonia Residencial Vidriera, Monterrey) (ver Figura 7), caracterizada por ser células esféricas u ovaladas, poseer un solo cloroplasto, con un tamaño de 2 a 10 μm diámetro, sin flagelos. Esta selección es respaldada por sus reportes de alta tasa de fijación de carbono y alta producción de biomasa (Tabla 16) (Feng *et al.*, 2014)

Tabla 16: Productividad Reportada para *Chlorella*.

Cepa	Productividad de biomasa (mg/L/día)	Concentración de biomasa (g/L)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	297 ± 20	2.18 ± 0.18	(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Chlorella sp.</i>	364 ± 25	2.65 ± 0.13	



Figura 7. Morfología microscópica (100x) encontrada en la muestra 5, típica del género *Chlorella*.

5.3 Desarrollo de un Método de Criopreservación Específico para Microalgas Seleccionadas

Con la finalidad de evaluar la viabilidad de las microalgas después de un proceso de crioconservación, se realizó un ensayo de la tolerancia a diferentes agentes crioprotectores (ACP) al reactivar el cultivo después de haber sido criopreservado a -20 °C. Para ello, a partir de la biomasa producida se tomaron inóculos, los cuales se incubaron en DMSO y CH_3OH al 2, 4, 6, 8, 10 y 12% por 2 horas, se observó que las cepas que continuaron su crecimiento normal corresponden a aquellas incubadas en DMSO al 8 y 12% y CH_3OH al 6 y 10%, por este motivo se seleccionaron para su criopreservación a -20 °C.

Una vez reactivados los cultivos se observó que el uso de DMSO al 8% y CH_3OH al 6% (Figura 8) permitieron una reactivación adecuada del microorganismo después de 7 días de incubación, a diferencia de las muestras incubadas en agua destilada y $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ al 30%, los cuales se emplearon como controles y no conservaron la viabilidad. Esta prueba es cualitativa de corto plazo, por lo tanto, la selección de ACP está basada en la preservación de la viabilidad del microorganismo al cabo de 7 días mediante una evaluación visual.

En un estudio realizado en *Chlorella vulgaris* con CH_3OH al 5% se observó que se conservaba una viabilidad del 98.2% al cabo de 15 días de congelación y al cabo de 150 y 300 días la viabilidad fue en 97.6% y 95.8% respectivamente (Silva *et al.*, 2020). Por otro lado, la viabilidad de *Chlorella sorokiniana* al usar DMSO al 7% se conservó en un 80% al cabo de 15 días de congelación (Fernandes *et al.*, 2019). Estas concentraciones

son similares a las obtenidas en el presente estudio, sin embargo, un análisis cuantitativo a largo plazo podría contribuir a tener un mejor conocimiento de esta cepa.

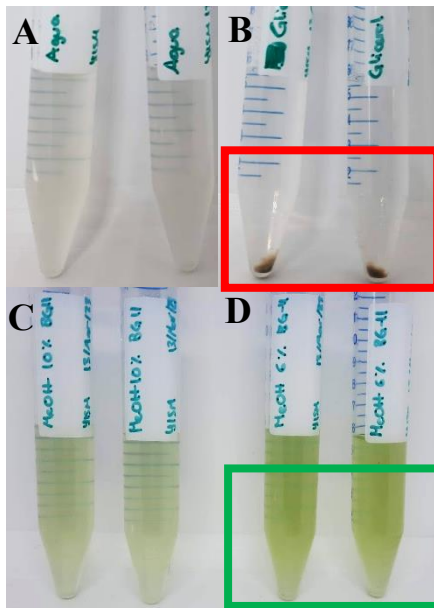


Figura 8. Comparación del comportamiento del cultivo reactivado al cabo de 7 días de congelación. (A) agua destilada, (B) $C_3H_8O_3$ al 30 % (C) CH_3OH al 10 % y D) CH_3OH al 6 %. En el cuadro rojo se aprecia la biomasa sedimentada que no logró ser reactivada en las condiciones provistas, mientras que en el cuadro verde se aprecia el aumento de la biomasa después de su reactivación e incubación.

5.4 Optimización de Producción de Biomasa de la Microalga Seleccionada

5.4.1 Identificación de Factores Relevantes con un Diseño Plackett-Burman

Algunas de las limitantes para la comercialización a gran escala de la biomasa son los costos altos en su producción debidos principalmente a que la biomasa se encuentra a una concentración de 0.1 a 0.5% en los medios de cultivo, lo que implica el uso de volúmenes muy grandes de agua y el uso de equipo especializado para su aireación, mezclado, cosecha y procesamiento. Por estas razones el costo energético llega a ser

incluso superior al contenido energético que puede aportar la biomasa (Subramanian & Sayre, 2022).

En este sentido, es necesario establecer las condiciones que permitan la mayor producción de biomasa en el menor tiempo posible. Por lo anterior, se realizó un estudio exploratorio Plackett-Burmann que permitiera identificar aquellos factores de mayor relevancia para el crecimiento y producción de biomasa de estos microorganismos. La Tabla 17 nos permite apreciar la densidad celular alcanzada al cabo de 14 días de incubación para cada una de las corridas establecidas para este diseño.

Tabla 17. Resultados del Diseño Plackett-Burman

Corrida	Temperatura	Fotoperiodo (Luz:oscuridad)	Intensidad	Agitación	pH	Medio	Contenedor	Crecimiento (células/mL)
1	33	8:16	200	Con	7	BG11	Matraz	3.74×10^7
2	23	24:0	200	Con	7	BBM	Tubo	9.15×10^6
3	33	8:16	60	Sin	9	BBM	Matraz	2.37×10^7
4	33	24:0	200	Sin	7	BBM	Matraz	5.18×10^8
5	23	8:16	60	Sin	7	BBM	Tubo	4.19×10^6
6	23	24:0	200	Sin	9	BG11	Matraz	3.94×10^8
7	33	24:0	60	Sin	7	BG11	Tubo	4.60×10^6
8	23	8:16	60	Con	7	BG11	Matraz	2.72×10^8
9	23	8:16	200	Sin	9	BG11	Tubo	8.16×10^6
10	23	24:0	60	Con	9	BBM	Matraz	4.94×10^8
11	33	24:0	60	Con	9	BG11	Tubo	6.18×10^6
12	33	8:16	200	Con	9	BBM	Tubo	2.73×10^7

El comportamiento del factor de respuesta en cada corrida permite observar que todas las condiciones permiten un aumento en la cantidad de células por mililitro, ya que todos los niveles se encuentran dentro de los rangos favorables para la producción de

biomasa (Maltsev *et al.*, 2021; Andersen, 2005; Lavens & Sorgeloos, 1996). Sin embargo, la combinación de estos factores influye en el comportamiento del crecimiento, por este motivo, a partir de los resultados observados, se realizó un análisis empleando una Gráfica de Pareto (Figura 9), en la que podemos observar que el contenedor y fotoperiodo son factores importantes para considerar. Además, la interacción entre la temperatura e intensidad de luz demostró que es significativa para la generación de biomasa empleando este modelo factorial, por este motivo estos parámetros fueron considerados en el diseño de experimentos de optimización.

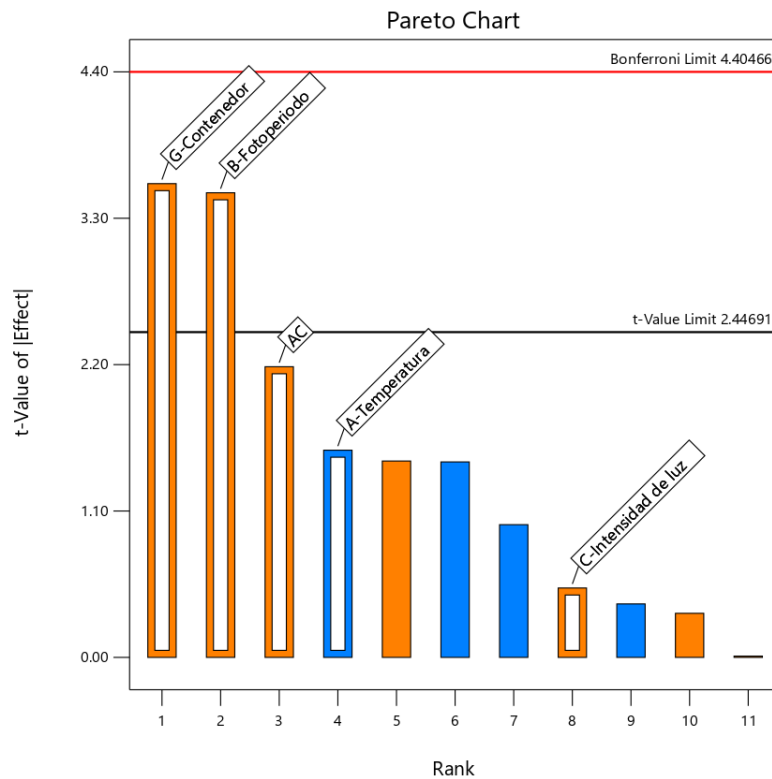


Figura 9. Gráfica de Pareto. Se indican los factores más relevantes para la producción de biomasa de la cepa candidata a *Chlorella*.

Cabe mencionar que el análisis de varianza mostró un *p-value* de 0.0147, resultando en un modelo estadísticamente significativo, los cuales se pueden observar en la Tabla 18.

Tabla 18: ANOVA para el Modelo Factorial.

Origen	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-value	p-value	
Modelo	40.94	8.19	7.49	0.0147	significativo
A-Temperatura	2.66	2.66	2.43	0.1701	
B-Fotoperiodo	13.35	13.35	12.21	0.0129	
C-Intensidad de luz	0.2975	0.2975	0.2721	0.6206	
G-Contenedor	13.89	13.89	12.70	0.0119	
AC	5.23	5.23	4.78	0.0715	
Residual	6.56	1.09			
Cor Total	47.50				

Considerando que el contenedor es un factor de tipo categórico y que fue establecido como uno de los más importantes, ya que se presenta una producción mayor de biomasa con el uso de matraz comparada con la densidad celular obtenida en los ensayos realizados en tubo, se estableció el uso del matraz para realizar la optimización, quedando descartado el uso de tubos.

Las características de la luz tienen una gran influencia sobre el crecimiento y metabolismo de las microalgas, por lo tanto, pueden ser aprovechadas para controlar el crecimiento y composición de la biomasa dependiendo de la aplicación que se busque (Schulze *et al.*, 2014).

Se ha observado que al manipular el fotoperiodo es posible incrementar la productividad de las microalgas. Lo anterior es debido a que se incrementa la eficiencia de absorción de luz y se altera la composición bioquímica, en combinación con variaciones de la intensidad de luz (Maltsev *et al.*, 2021). Este efecto fue visible en un

estudio realizado en *Chlorella sorokiniana* cultivada en agua de cocción de capullos en un biorreactor de columna de burbujeo, en donde se observó que la mayor productividad y concentración de biomasa fue lograda con una intensidad de luz de $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16:8. Además de que estas condiciones promovieron eficiencias de remoción de amonio, nitrógeno total, fósforo total y DQO de hasta 93.12 %, 80.79 %, 93.08 % y 69.08 %, respectivamente (Gao *et al.*, 2022).

Debido a la importancia de la luz para el crecimiento de estos microorganismos, el rango elegido para este ensayo fue de 60 a $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ debido a que la intensidad óptima para su crecimiento se encuentra descrita dentro del rango de 26 a $400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Li *et al.*, 2023).

Por lo anterior, se utilizaron lámparas de luz LED para todos los ensayos, tomando en cuenta sus especificaciones fotométricas (Figura 10), tales como la luz blanca fría con temperatura de color de 6,500 K, caracterizada por ser altamente fotosintética debido a su pico de emisión azul (440 - 460 nm) que coincide con el espectro de absorción de los complejos de captura de luz por pigmentos en plantas y microalgas, así como las longitudes 660 - 680 que son captadas por la clorofila a y b (Schulze *et al.*, 2014). Cabe mencionar que también se ha considerado la utilización de la luz solar, sin embargo, los ciclos día/noche, cambios en las condiciones meteorológicas, cambios de estación y fluctuaciones en la radiación dificultan la uniformidad y control de las condiciones de luz (Blanken *et al.*, 2013).

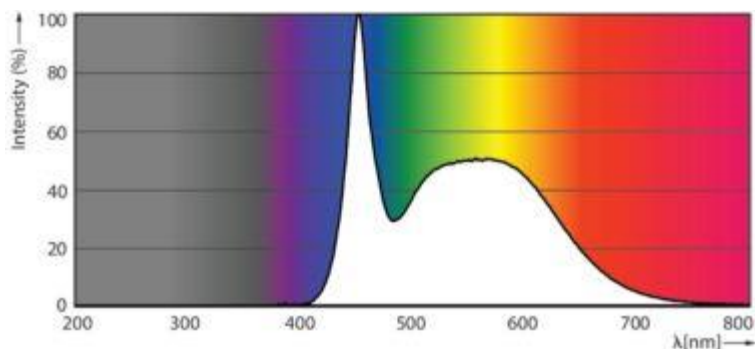


Figura 10: Distribución de color en el espectro de las lámparas LED utilizadas en este proyecto. (Philips, 2023)

5.4.2 Estudio de Optimización Basado en un Diseño Central Compuesto

A partir de los factores más importantes definidos por el diseño Plackett-Burman, se llevó a cabo la optimización del proceso por medio de un Diseño Central Compuesto Circunscrito. En la Tabla 19 podemos observar los niveles evaluados para cada factor, así como el resultado obtenido en la producción de biomasa en número de células por mililitro.

Tabla 19. Resultados de la Optimización Realizada Mediante un CCD Circunscrito

Corrida	Temperatura	Fotoperiodo	Intensidad de luz	Crecimiento (Células/mL)
1	43.409	16.4746	410	4.35×10^8
2	35	24	410	2.95×10^8
3	40	20.9492	600	3.24×10^8
4	35	16.4746	410	2.54×10^8
5	35	16.4746	410	2.52×10^8
6	35	16.4746	410	2.78×10^8
7	35	16.4746	410	2.96×10^8
8	35	16.4746	90.4594	3.83×10^8
9	35	16.4746	410	2.37×10^8
10	35	16.4746	410	2.49×10^8
11	30	20.9492	600	3.54×10^8
12	30	12	220	3.15×10^8
13	35	16.4746	729.541	4.73×10^6
14	30	12	600	3.07×10^8
15	35	8.94925	410	3.80×10^8

16	30	20.9492	220	3.18 x 10 ⁸
17	40	12	220	1.16 x 10 ⁸
18	40	12	600	2.90 x 10 ⁸
19	26.591	16.4746	410	3.37 x 10 ⁸
20	40	20.9492	220	3.65 x 10 ⁸

Por otro lado, a partir de los factores que no fueron elegidos en el diseño Plackett-Burman (medio, pH y agitación) se establecieron los niveles con los que se realizó la optimización. El medio BBM (Apéndice 1) fue elegido ya que se ha observado que *Chlorella vulgaris* presenta tasas de fijación de CO₂ superiores a las demostradas por el uso de medio BG-11 (Li *et al.*, 2023). Se seleccionó trabajar con un pH de 7 ya que se encuentra dentro del rango utilizado para el cultivo de la mayoría de las microalgas (Lavens & Sorgeloos, 1996). Finalmente, se prescindió de la agitación para realizar estos ensayos a nivel de laboratorio por motivos de factibilidad técnica. Estos valores se pueden observar en la Tabla 20.

Tabla 20. Condiciones Definidas para la Ejecución del CCD que no Fueron Incluidas en el Análisis

Factor	Nivel
Medio	BBM
pH	7
Agitación	No

El análisis de varianza se realizó a través de un modelo cúbico reducido, mediante el que se definen los términos que se incluirán en el análisis. Bajo este modelo se obtuvo un *F-value* de 29.54, *p-value* de 0.0002 (Ver Tabla 21) y un valor de R² de 0.9846. Considerando que la significancia de un coeficiente es mayor conforme el *F-value* aumenta y *el p-value* disminuye, estos resultados indican que los coeficientes son significativos (Y. R. Lee & Chen, 2016). Se observa también un valor no significativo en

la prueba de falta de ajuste, lo cual es favorable, ya que la falta de ajuste ocurre en caso de que no se incluyan términos importantes en el análisis o si el modelo no es capaz de describir la relación entre los factores experimentales y el factor de respuesta. La ecuación del modelo de predicción se expresa a continuación (3):

$$\begin{aligned} \text{Crecimiento} = & -157.253 + 11.5399(A) + -0.7772(B) + 0.29727(C) + -0.197631(AB) + \\ & -0.0181383(AC) + 0.00239657(BC) + -0.196054(A^2) + 0.200735(B^2) + -7.14789 \times 10^6 \\ & (C^2) + -7.56316 \times 10^5(ABC) + 0.00598397(A^2B) + 0.000278894(A^2C) + - \\ & 0.00537962(AB^2) \end{aligned} \quad (3)$$

Tabla 21: ANOVA para un Modelo Cúbico Reducido

Origen	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-value	p-value	
Modelo	16.87	1.30	29.54	0.0002	Significativo
A-Temperatura	0.4714	0.4714	10.73	0.0169	
B-Fotoperiodo	0.3611	0.3611	8.22	0.0285	
C-Intensidad de luz	7.14	7.14	162.58	< 0.0001	
AB	0.6751	0.6751	15.37	0.0078	
AC	0.1381	0.1381	3.14	0.1266	
BC	0.3630	0.3630	8.26	0.0283	
A ²	2.57	2.57	58.40	0.0003	
B ²	0.8952	0.8952	20.38	0.0040	
C ²	0.9596	0.9596	21.84	0.0034	
ABC	0.8269	0.8269	18.82	0.0049	
A ² B	1.48	1.48	33.80	0.0011	
A ² C	5.82	5.82	132.38	< 0.0001	
AB ²	0.9611	0.9611	21.88	0.0034	
Residual	0.2636	0.0439			
Falta de ajuste	0.0298	0.0298	0.6379	0.4607	No significativo
Error Puro	0.2338	0.0468			
Cor Total	17.13				

Además, en las Figuras 11, 12 y 13 se muestran las gráficas tridimensionales obtenidas por RSM en donde cada una representa el comportamiento de la respuesta de dos de los tres factores analizados dentro del rango establecido para este diseño (Kim *et al.*, 2019). Las condiciones óptimas para la producción de biomasa se obtuvieron a partir

de los resultados del análisis estadístico, donde se establece que las mejores condiciones dentro de los puntos factoriales son una temperatura de 33.4 °C, fotoperiodo de 12:12 y una intensidad de luz de 220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una respuesta predicha de 3.92×10^8 células por mililitro. Por otro lado, al incluirse en el rango de optimización los puntos axiales para todos los factores se predice que las mejores condiciones serían una temperatura de 43.2 °C, fotoperiodo de 19:5 y una intensidad de luz de 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una respuesta predicha de 5.93×10^8 células por mililitro.

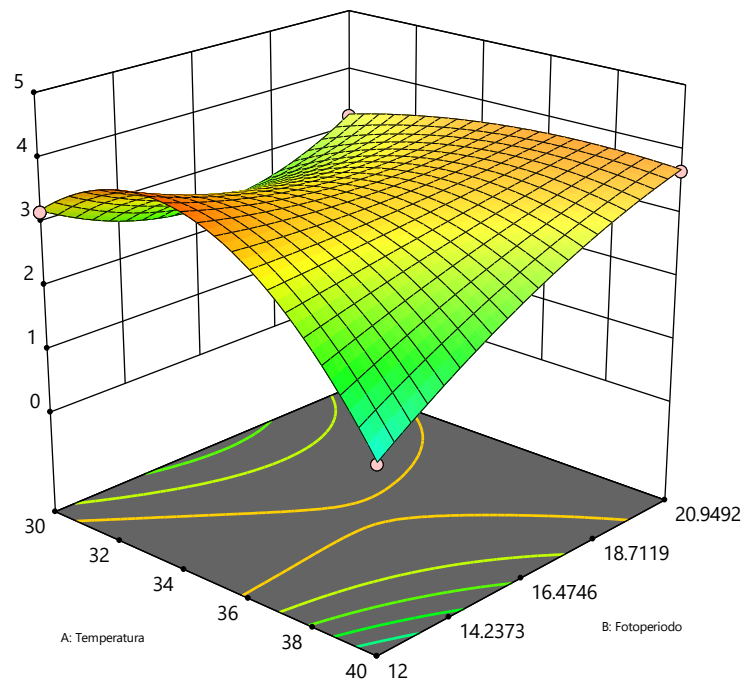


Figura 11. Gráfica de superficie de respuesta tridimensional correspondiente al crecimiento de biomasa respecto a la temperatura y fotoperiodo.

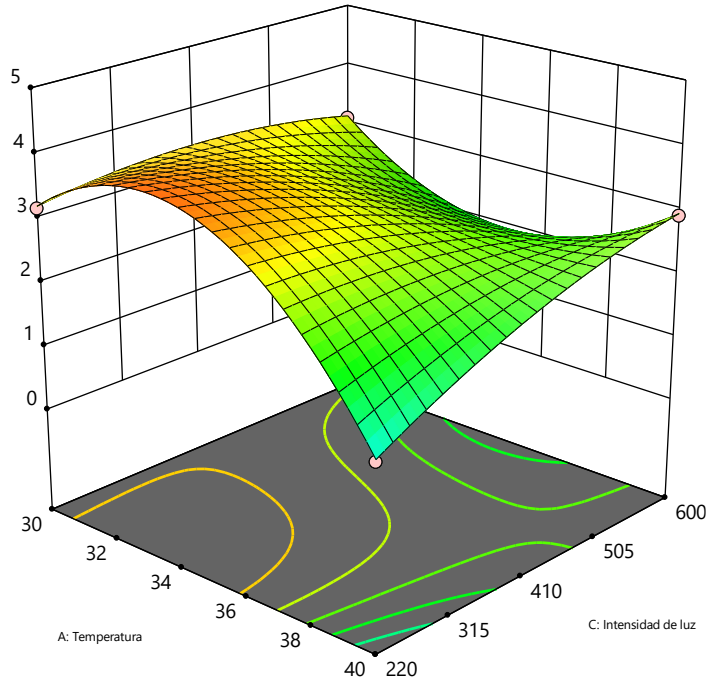


Figura 12. Gráfica de superficie de respuesta tridimensional correspondiente al crecimiento de biomasa respecto a la temperatura e intensidad de luz.

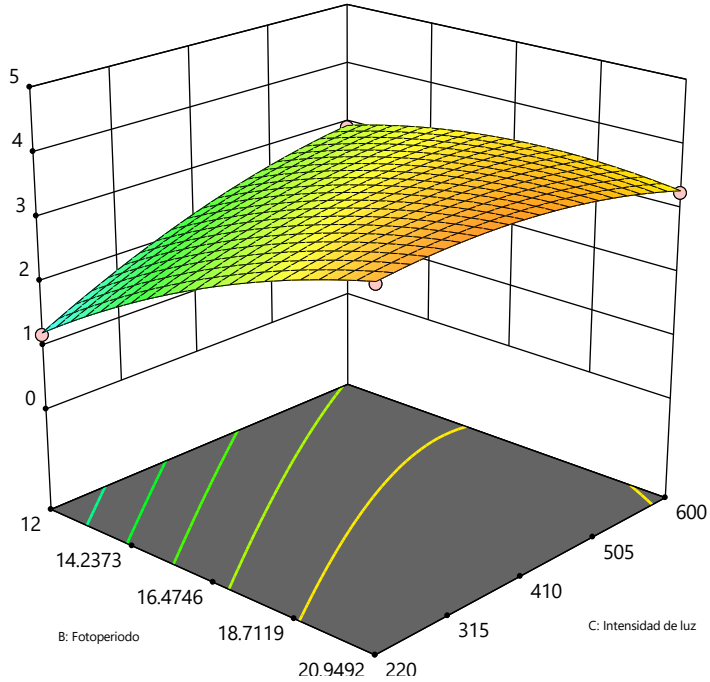


Figura 1013. Gráfica de superficie de respuesta tridimensional correspondiente al crecimiento de biomasa respecto al fotoperiodo e intensidad de luz.

Se realizaron réplicas experimentales a temperatura de 35°C, con una intensidad de luz de 410 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 16.5:7.5 con el objetivo de comparar la respuesta predicha por el modelo con los valores experimentales, como se puede observar en la Tabla 22, el promedio de la respuesta experimental se encuentra dentro del intervalo predicho con un error del 4.21 % con respecto al valor predicho por el modelo.

Tabla 22. Comparación Entre la Respuesta Obtenida en la Prueba Confirmatoria y su Predicción

Análisis	Valor predicho	Desviación estándar	95 % Intervalo Predicho (bajo)	Promedio experimental	95 % Intervalo Predicho (alto)	% error
Crecimiento	2.61×10^8	2.64×10^7	2.32×10^8	2.72×10^8	2.91×10^8	4.21 %

La temperatura es un factor importante en la regulación fisiológica y morfológica de las microalgas, esto tiene impacto en la fotosíntesis y, por lo tanto, en la fijación de CO₂, considerando que la solubilidad del CO₂ disminuye a medida que la temperatura aumenta. Por lo anterior es importante considerar un equilibrio adecuado para obtener el mejor resultado posible. Por otro lado, se ha establecido el rango de 15 a 20 °C como el rango óptimo para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, este rango es variable de acuerdo con las condiciones del hábitat a partir del cual la cepa fue aislada (Lee *et al.*, 2014a) tal como se observa en los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que se predice una temperatura óptima de hasta 43 °C para la

producción de biomasa. Lo anterior tiene sentido al considerar las condiciones meteorológicas del municipio de Monterrey, Nuevo León, de donde este microorganismo fue aislado, y que durante el periodo de 1951 a 2018 ha presentado temperaturas máximas de hasta 46 °C (Servicio Meteorológico Nacional, 2018). Las algas termo-tolerantes presentan una ventaja para la remoción de contaminantes a temperaturas mayores, lo que representa un ahorro en sistemas de enfriamiento y una alternativa atractiva para las plantas de poder por combustión de gases (Raeesossadati *et al.*, 2014).

A partir de los resultados obtenidos se observa que los fotoperiodos con tiempos prolongados de luz favorecen el aumento de la biomasa, sin embargo, no se recomienda el uso de luz continua, ya que se ha reportado que puede dar lugar a procesos de fotoinhibición, por el contrario, la inclusión de periodos de oscuridad permite la restauración del daño en los fotosistemas (Yustinadiar *et al.*, 2020). Además, los sistemas que usan ciclos combinados de luz y oscuridad incrementan la eficiencia de absorción de luz y reducen el consumo de energía y, por ende, la productividad de las microalgas, lo cual es de especial interés para su aplicación biotecnológica (Maltsev *et al.*, 2021). Es por este motivo que en este estudio los fotoperiodos de 12 y 18 horas de luz resultaron adecuados para obtener mayores concentraciones de biomasa. De forma similar, se ha observado que el fotoperiodo de 20:4 en *Chlorella kessleri* ha sido detectado como aquel en que esta especie produce la mayor cantidad de biomasa en cultivos mixotróficos.

Finalmente, al observar la cantidad de biomasa obtenida a partir de la corrida con el nivel más alto de luz ($729.541 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el aspecto del cultivo al terminar el periodo de incubación (Figura 14) es evidente la pérdida de pigmentación en las células y una densidad muy baja de células, esto es debido a que el uso de niveles inadecuados de

luz tiene efectos negativos en el crecimiento de microalgas, causando fotoinhibición, oxidación y blanqueamiento (Andersen, 2005). Por otro lado, si la manipulación de la intensidad de luz es adecuada, es posible alterar el metabolismo y composición bioquímica de estos microorganismos, como el contenido de pigmentos como carotenoides (Khajepour *et al.*, 2015), astaxantina (Liyanaarachchi *et al.*, 2020), clorofila, ficoeritrinas, ficocianinas y fucoxantinas, así como la producción y acumulación de lípidos y ácidos grasos (Maltsev *et al.*, 2021).

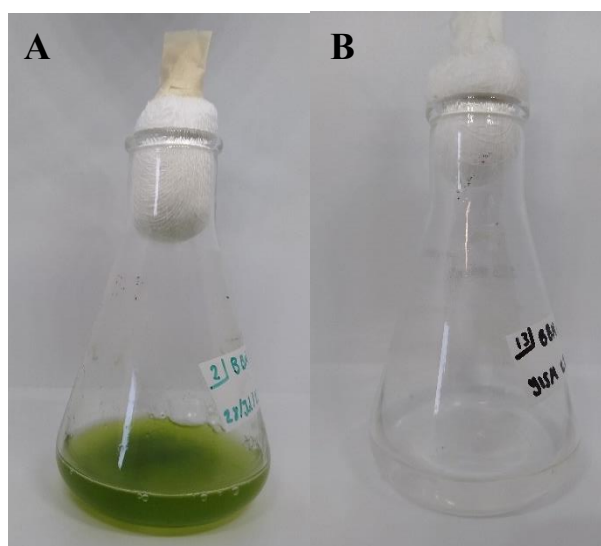


Figura 14. Cultivos obtenidos durante la optimización. (A) Se observa la apariencia típica de un cultivo de *Chlorella* al cabo de 11 días de incubación. (B) Apariencia de un cultivo afectado por la fotoinhibición y blanqueamiento.

5.5 Separación y Recuperación de la Fracción Pesada del Lisado Citoplasmático para la Obtención de la Enzima RuBisCO de la Cepa Seleccionada

5.5.1 Electroforesis

El extracto crudo obtenido por lisis presentó una concentración de proteínas de 7.62 mg/mL, y del cual posteriormente se tomó una porción del extracto para ser cargado en un gel de electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 15 podemos observar el resultado del gel de electroforesis, donde el primer carril presenta las bandas correspondientes al marcador de peso molecular y en el segundo carril las bandas correspondientes al perfil proteico del extracto.

De estos resultados podemos resaltar la presencia de 2 bandas a tamaños de ~55 kDa y ~17 kDa, estas bandas coinciden con el peso correspondiente a las subunidades grandes, reportadas entre los 50 - 54 kDa y a las subunidades pequeñas de entre 10 - 17 kDa, características de la forma I de la proteína RuBisCO, cuya estructura hexadecamérica es típica en las microalgas (8 subunidades grandes y 8 subunidades pequeñas) (Teuling *et al.*, 2019; Orellana & Perry, 1992).

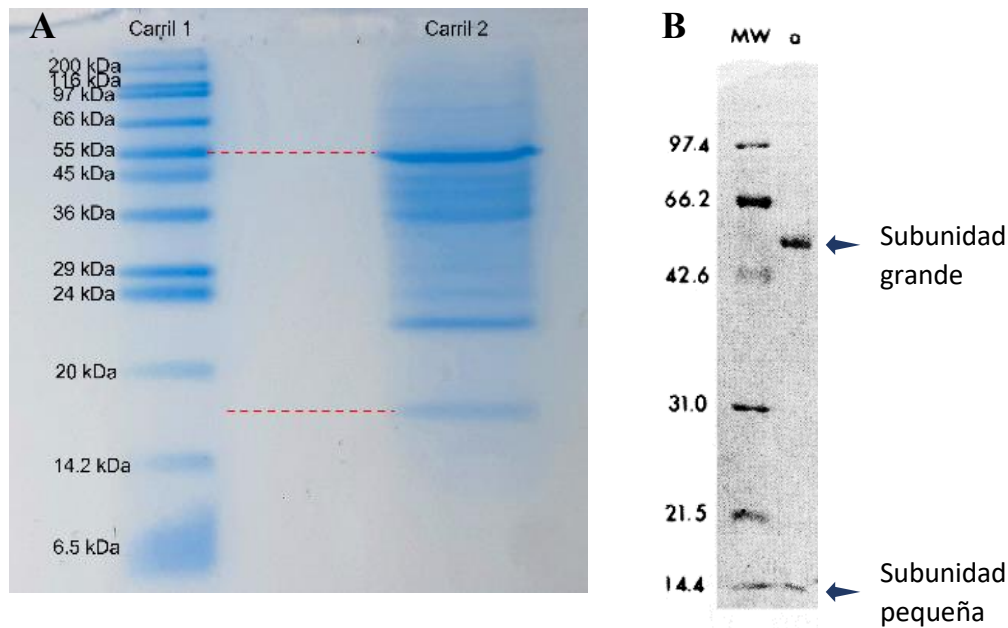


Figura 15. A) Gel de electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo B) Gel de electroforesis de una enzima comercial RuBisCO purificada a partir de *Spinacia oleracea*. Nota. Adaptado de “An immunoprobe to measure Rubisco concentrations and maximal photosynthetic rates of individual phytoplankton cells” (p. 484) por Orellana & Perry, 1992, *Limnology and oceanography*, 37(3)

5.5.2 Fraccionamiento por Tamaño de Corte

A partir del extracto crudo se realizó un barrido de 200 a 800 nm para obtener un perfil completo. En la Figura 16 se pueden observar los picos característicos de las clorofilas en regiones de 400 - 510 nm y 600 - 700 de acuerdo con Kwan *et al.*, la clorofila *a* absorbe a 430 nm (luz azul-violeta) y 660 nm (luz roja), mientras que la clorofila *b*, que se encuentra solo en algas verdes, euglenófitas y ciertos tipos de algas, absorbe a 435 nm (luz azul) y 645 nm (luz roja) (Kwan *et al.*, 2021). Cabe mencionar que, de acuerdo con la literatura, la ficocianina absorbe a 620 nm y la mayoría de los carotenoides se encuentran entre 400 y 500 nm. Por lo cual, de acuerdo con el perfil del espectro de absorción obtenido a partir del extracto RuBisCO, podemos intuir que el microorganismo (candidato a *Chlorella*) también fue capaz de producir los pigmentos antes mencionados.

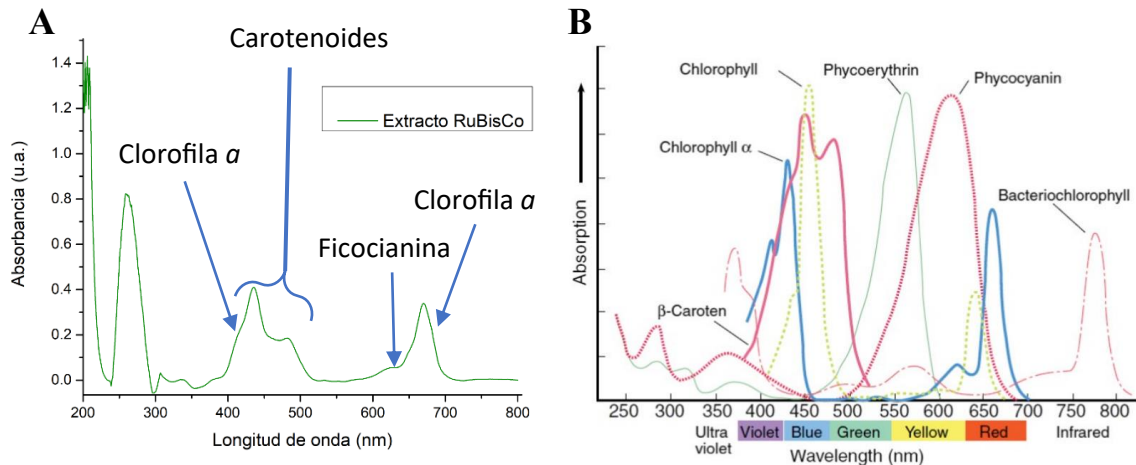


Figura 16. Comparación del espectro en el extracto (A) Perfil obtenido a partir del extracto crudo. (B) Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos (Kwan *et al.*, 2021)

También es importante destacar el pico observado a los 270 nm, el cual es atribuido a la presencia de la enzima RuBisCO (Figura 17). Lo anterior debido a que, al realizar el escaneo de la enzima comercial y compararlo con el perfil del extracto enzimático, se puede identificar el mismo pico, el cual está reportado como característico de las estructuras triptófano/tirosina de la RuBisCO (enlaces amida) (Liang *et al.*, 2008).

Además, la Figura 17 también muestra el perfil de la enzima obtenida a partir de la fracción mayor a 100 kDa, retenida mediante un centrífugo con una membrana de tamaño de corte de 100 kDa, el cual fue elegido debido al alto peso molecular de estas enzimas de alrededor de 560 kDa (Teuling *et al.*, 2019). La separación se realizó con el extracto obtenido a partir de la lisis, así como con la enzima comercial (Figura 18). Tal como se observa en ambas gráficas, el pico característico a 270 nm disminuye considerablemente en el filtrado de la solución, por lo cual se puede inferir la retención en la membrana del centrífugo. En el caso de la solución de la enzima comercial se obtuvo una retención de alrededor del 85 %, mientras que del extracto enzimático la retención fue del 90 %. considerando la disminución de la absorbancia en la fracción filtrada con respecto al pico

de absorción inicial. En ambos casos, se obtiene una fracción con alto contenido de enzimas RuBisCO.

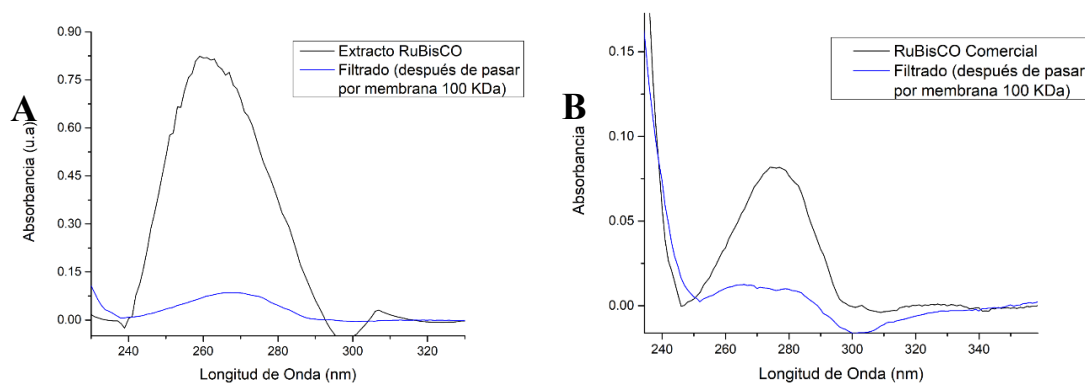


Figura 17. Perfiles correspondientes al barrido realizado por espectrofotometría de la enzima comercial y el extracto enzimático durante el proceso de retención por membranas de 100kDa. (A) Perfil obtenido a partir de la separación del extracto crudo. (B) Perfil obtenido a partir de separación de la solución con la enzima RuBisCO comercial

5.6 Condiciones de Reacción de la Enzima RuBisCO

Las condiciones de reacción para la enzima RuBisCO fueron implementadas a partir de la metodología establecida por Lilley *et al.*, la cual consistió en una mezcla de reacción de compuesto por un buffer de activación pH 8.1, que contenía Tris-HCl a 25 mM, 0.1 mM EDTA, 3 mM MnCl₂, 0.6 mM NaHCO₃ (Lilley *et al.*, 2010). El sustrato de la enzima fue ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) a una concentración de 0.7 mM y la concentración de la RuBisCO fue 0.05 mg/mL. Una vez iniciada la reacción enzimática, esta se dejó durante 15 minutos, considerando que es el tiempo mínimo que la literatura reportaba para dicha reacción, la cual fue monitoreada por espectrofotometría UV-Vis, a través de barridos en longitud de onda, en un rango de 200 a 800 nm. Así mismo se realizó un barrido de la solución buffer, del buffer solo con el sustrato (Buffer + RuBP) y el buffer

solo con la enzima (Buffer + RuBisCO) para tener como referencia los perfiles de las soluciones control (Figura 18). Con estos resultados podemos discriminar aquellos picos que están relacionados con el buffer y diferenciar los que están relacionados con el consumo del sustrato y la aparición del producto de la reacción (3-PGA) a los 220 nm (Jakob & Saenger, 1985). En la Figura 19b se presenta el acercamiento de la gráfica en la región de los 200 a 300 nm, en donde podemos observar con mayor claridad el pico de absorbancia del 3-PGA, el cual está ausente en el espectro obtenido en las soluciones control. Cabe mencionar que, en el perfil de la reacción también aparece un pico de menor tamaño a los 236 nm que no se encuentra en ninguno de los otros perfiles, lo que podría indicar la generación de un subproducto de reacción.

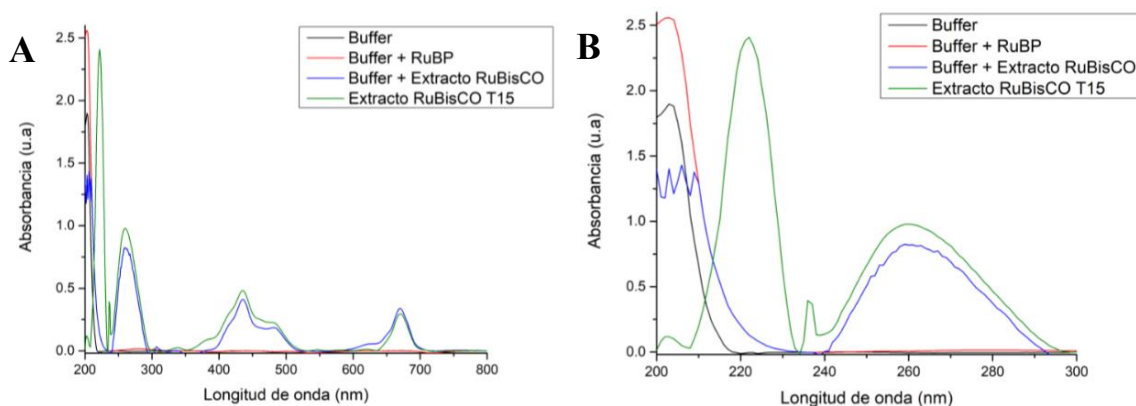


Figura 18. Condiciones de reacción del extracto RuBisCO. (A) Espectro de absorción por barrido de longitud de onda de 200 - 800 nm de la reacción enzimática con el extracto enzimático RuBisCO y sus soluciones control. (B) Acercamiento a la región 200 - 300 nm para observar la presencia del pico del 3-PGA a los 220 nm después de 15 min de reacción (T15)

Así mismo, se realizó el monitoreo de la reacción enzimática con la enzima comercial, bajo las condiciones antes mencionadas. En la Figura 19 se puede observar el espectro de absorción obtenido de las soluciones control y de la reacción a los 15 minutos. Al igual que en las gráficas anteriores, se puede observar la aparición de un pico a 220 nm

y otro más pequeño a 236 nm en el perfil correspondiente a la reacción al cabo de los 15 minutos, indicando la presencia del producto de reacción, 3-PGA.

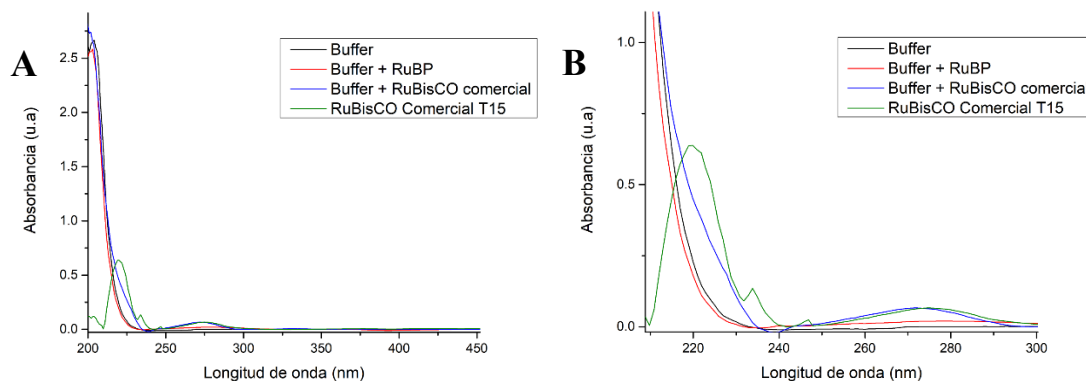


Figura 19.12. Condiciones de reacción con la enzima RuBisCO comercial (A) Espectro de absorción por barrido de longitud de onda de 200 - 800 nm de la reacción enzimática con la enzima comercial RuBisCO y sus soluciones control. B) Acercamiento a la región 200 - 300 nm para observar la presencia del pico del 3-PGA a los 220 nm después de 15 min de reacción (T15)

5.7 Comparación de la Enzima RuBisCO del Microorganismo Seleccionado Contra una Enzima Comercial

A partir de un barrido por espectrofotometría de 200 a 800 nm al extracto RuBisCO y a RuBisCO comercial se compararon sus perfiles (Figura 20), en donde podemos observar que están ausentes los picos característicos de la clorofila, en la solución comercial de la enzima RuBisCO, la cual es congruente ya que al ser un producto comercial fue sometida a un proceso de purificación y no cuenta con dichos pigmentos. Cabe mencionar que en la Figura 21b, que presenta el aumento en la región 220 - 320 nm, se puede observar el pico de la RuBisCO a los 270 nm, tanto en el extracto enzimático como en la solución de la enzima comercial. Sin embargo, es notoria la diferencia en el tamaño de los picos, ya que el extracto RuBisCO contaba con una concentración de 1.8

mg/mL mientras que la solución de RuBisCO comercial se encontraba a una concentración de 0.05 mg/mL.

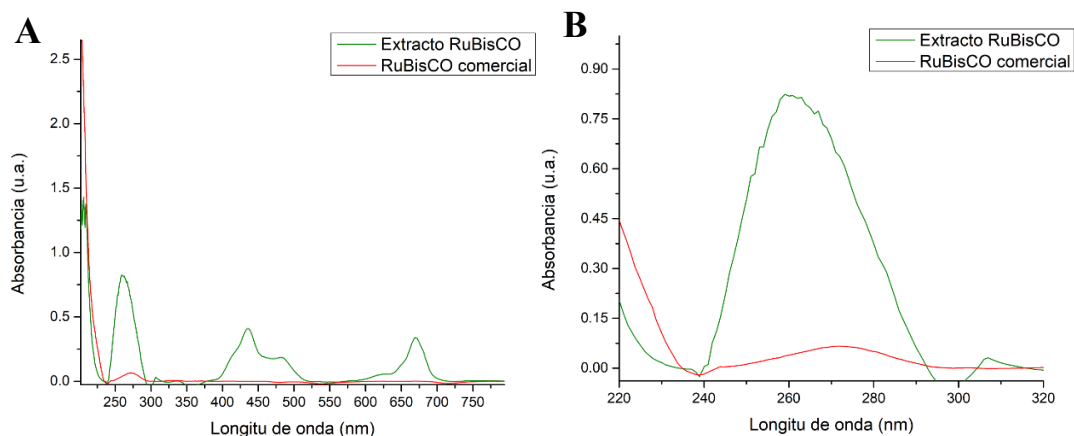


Figura 20. Comparación de los perfiles entre RuBisCO comercial y extracto RuBisCO. (A) Espectro de absorción por barrido de longitud de onda de 200 - 800 nm. (B) Acercamiento a la región 200 - 300 nm para observar la presencia del pico del 3-PGA a los 220 nm

5.8 Prueba Concepto para Evaluar la Conversión de RuBP a 3-PGA por Acción de la Enzima RuBisCO y la Factibilidad Tecnológica de su Obtención a Nivel de Laboratorio

Una vez que se comprobó que las condiciones de reacción establecidas eran las adecuadas para favorecer la capacidad de catálisis tanto de la RuBisCO comercial como de la recuperada en el extracto enzimático, se procedió a realizar el seguimiento de conversión del sustrato RuBP a través del tiempo. Para ello, la solución de reacción, tanto con la enzima comercial como con la del extracto enzimático, fue monitoreada cada 30 minutos hasta alcanzar un tiempo de reacción de 1.5 horas, obteniendo distintos perfiles en los espectros de absorción UV-Vis. Cabe mencionar que durante este monitoreo se

analizó con especial énfasis la región cercana a los 220 nm, monitoreando la aparición y cambios en el pico característico del 3-PGA, producto de conversión del sustrato RuBP, a través de la reacción mediada por la enzima RuBisCO (Figura 21).

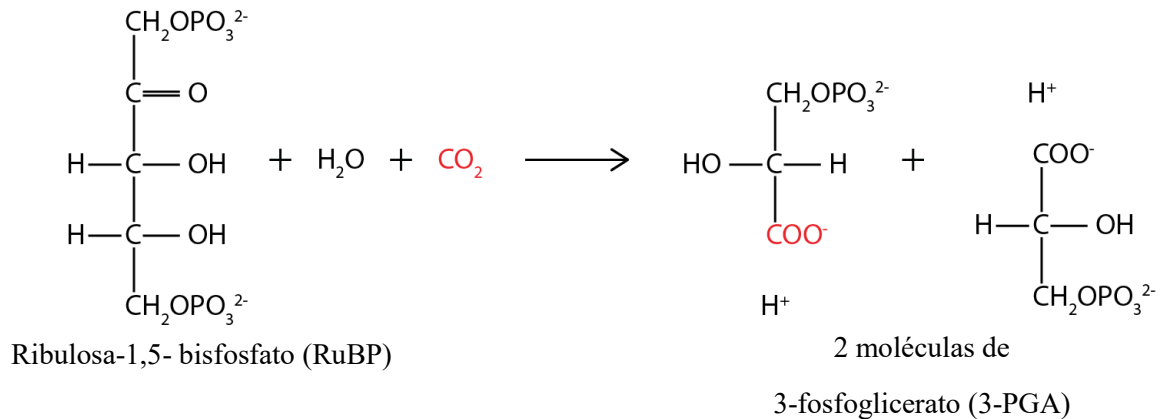


Figura 1321. Reactivos y productos de la reacción mediada por RuBisCO (Yen *et al.*, 1998)

La RuBisCO es responsable de la fijación del carbono, ya que incorpora este átomo a un azúcar fosfato (RuBP) a través de un proceso denominado carboxilación, que permite producir 2 moléculas de 3-PGA. Este mecanismo requiere de la activación de la enzima mediante una molécula con carbono que carbamila un residuo de lisina catalítico para unirse de forma reversible a un ion magnesio (Mg^{2+}) en el sitio activo, de lo contrario, la enzima permanece inactiva (Stec, 2012). Es por este motivo que es necesaria la presencia de una fuente de carbono en la reacción, ya que de ella no sólo depende la formación del producto, sino también la activación de la enzima. Cuando el carbono está disuelto en solución, puede estar disponible en 4 formas de carbono inorgánico (Ci), HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2CO_3 y CO_2 disuelto, la proporción en la que se encuentre depende del pH (Prasad *et al.*, 2021). El pH usado en este ensayo es de 8, en el que aproximadamente el 90 % del Ci está

en forma de HCO_3^- , que es la forma preferida de almacenamiento de C_i por las microalgas, ya que es hasta 1,000 veces menos permeable que las moléculas de CO_2 (Li *et al.*, 2023).

La Figura 22 permite observar el perfil de reacción, a lo largo de 1.5 horas (T90), empleando ambas enzimas RuBisCO, cuya presencia se observa con un pico alrededor de los 270 nm, tal como ya se había discutido previamente. En ambas reacciones se observa que la aparición del pico del 3-PGA, a los 220 nm (Jakob & Saenger, 1985), se mantiene en su punto máximo durante los primeros 30 minutos de reacción (T30), sin ningún cambio significativo en absorbancia. Mientras que al cabo de 1 hora (T60) se puede observar una disminución de su intensidad, así como la desaparición del pico a los 276 nm que se sospecha era un subproducto de reacción. Cabe mencionar que, al cabo de 90 minutos la absorbancia del pico de 3-PGA en la reacción de la enzima comercial decae hasta en un 23 %, mientras que para la reacción mediada por el extracto de RuBisCO la disminución fue cercana a un 70 %, lo cual sugiere la inestabilidad del compuesto o una posible degradación por factores en el medio de reacción. Sin embargo, a la par de la disminución del pico del 3-PGA (entre los 60 y 90 minutos) se observa también la aparición de un nuevo pico (de intensidad baja) alrededor de los 300 nm, lo cual también podría indicar la transformación del 3-PGA a algún otro compuesto (subproducto).

Sin embargo, más estudios tendrían que realizarse para poder elucidar su identidad, por ejemplo, por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Por otro lado, es importante mencionar que, durante la realización de este proyecto, no hubo reactivos estándar del 3-PGA disponibles comercialmente, por lo que solo fue posible evidenciar de forma cualitativa a través espectrofotometría la conversión del sustrato RuBP a 3-PGA por acción de la enzima RuBisCO.

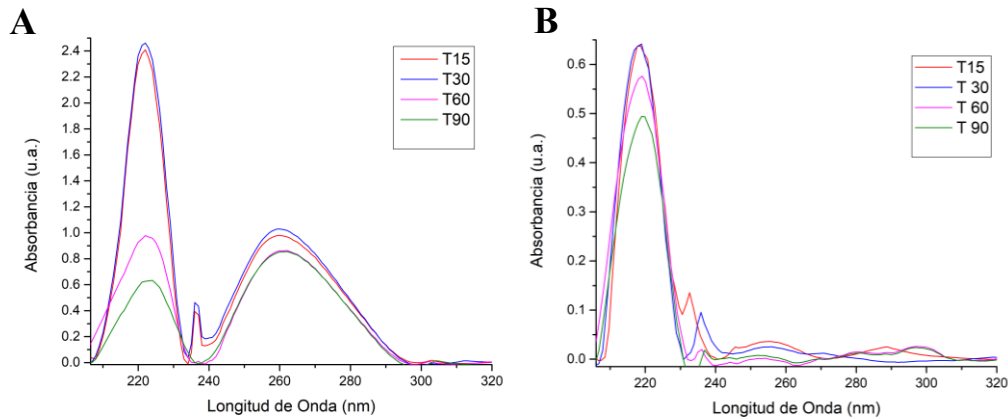


Figura 22: Perfil de reacción a lo largo de 1.5 horas. (A) Reacción enzimática con el extracto RuBisCO (B) Reacción enzimática con la enzima RuBisCO comercial

Finalmente, como parte del proyecto y buscando la implementación, así como factibilidad tecnológica de la producción de esta enzima, se llevó a cabo el cultivo de biomasa en el prototipo de fotobiorreactor mostrado en la Figura 23, cuyo diseño permitió adaptar las condiciones óptimas de cultivo (como temperatura, fotoperiodo e intensidad de luz) previamente establecidas en el proyecto. La Figura 23a muestra el frente del prototipo, al centro se encuentra el controlador digital de termostato que está conectado a la fuente de calor (cable blanco) y al sensor de temperatura (cable negro). La Figura 23b muestra la tapa del prototipo que contiene un set de lámparas ensamblado. El interior de la cabina se observa en la Figura 23c, que consta de un recubrimiento de paneles de unicel con ventilación en la base, en donde se encuentra también el emisor de calor de cerámica. El sensor de temperatura se encuentra fijado al panel del lado derecho. En la parte superior se encuentra el set de iluminación LED ensamblado en la tapa.

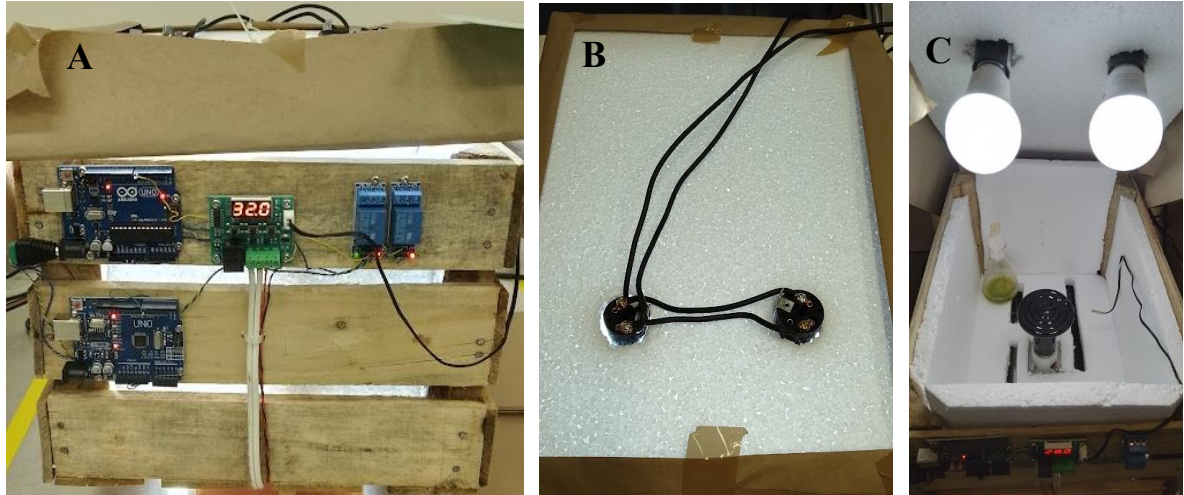


Figura 23. Prototipo de fotobiorreactor para la producción de microalgas. (A) Parte frontal con microcontrolador (B) Tapa con sistema de iluminación (C) Interior del prototipo

Una vez que el prototipo fue construido, se procedió a realizar una prueba confirmatoria con las siguientes condiciones: temperatura de 35 °C, fotoperiodo de 16.5:7.5 y una intensidad de luz de $410 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lo anterior con la finalidad de evaluar el desempeño de este prototipo en comparación con una incubadora convencional de laboratorio. El resultado de la biomasa obtenida empleando el prototipo se puede visualizar en la Tabla 22, dónde también se realiza la comparación con la respuesta predicha por el modelo estadístico de optimización (CCD Circunscrito). El valor de biomasa obtenido experimentalmente usando el prototipo fue de 2.72×10^8 (Tabla 22), la cual se encuentra dentro del intervalo predicho por el análisis estadístico. Cabe mencionar que esta respuesta en biomasa en el prototipo fue ligeramente mayor que la media obtenida durante los ensayos experimentales obtenidos con la incubadora convencional de laboratorio, con un error del 4.21%. Esta variabilidad puede deberse a la distribución de la luz en las incubadoras convencionales, ya que la ubicación de las lámparas y la superficie en la que se distribuye y refleja la luz (acero inoxidable en la incubadora y

unicel en el fotobiorreactor) influye en la cantidad de fotones que recibe la muestra (Schulze *et al.*, 2014; Yustinadiar *et al.*, 2020). Por lo cual, se puede concluir que el diseño del prototipo permitió un desempeño satisfactorio en la producción de microalgas nativas del estado de Nuevo León, en comparación con las incubadoras convencionales de nuestro laboratorio.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

A partir muestras de agua recolectadas de nichos ecológicos en el estado de Nuevo León, fue posible obtener distintas especies de microalgas, que por sus características morfológicas fueron identificadas como *Scenedesmus* y *Chlorella*, y un consorcio con *Selenastrum* y *Closterium*. De estas cepas, se seleccionó para el presente estudio el microorganismo candidato a *Chlorella*, considerando su destacada producción de biomasa. Por otro lado, los agentes crioprotectores con mayor recuperación de la viabilidad después de la reactivación de este microorganismo fueron el CH₃OH al 6 % y DMSO al 8 %.

Las condiciones óptimas para la producción de biomasa a escala laboratorio empleando el candidato a *Chlorella* fue una temperatura de 43.2 °C, fotoperiodo de 19:5 y una intensidad de luz de 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir de la producción de biomasa, se realizó un proceso de lisado para recuperar el extracto crudo donde se esperaba encontrar la enzima RuBisCO, cuya presencia fue evidenciada por electroforesis al observar la aparición de las bandas características de esta enzima. Dicha estructura está conformada típicamente de 8 subunidades grandes (52 - 54 kDa) y 8 subunidades pequeñas (10 – 17 kDa).

Adicionalmente, se construyó un prototipo de fotobiorreactor, cuyo resultado en la producción de biomasa fue sobresaliente y similar a aquellos provistos por una incubadora

comercial adaptada con iluminación, por lo cual fue posible demostrar la factibilidad tecnológica para trasladar el conocimiento generado a la sociedad.

Finalmente, se concluye que la enzima RuBisCO recuperada a partir del extracto crudo del microorganismo candidato a *Chlorella* es capaz de mediar la conversión de RuBP a 3-PGA en una prueba *in-vitro* en presencia de HCO_3^- como fuente de carbono figurando como una potencial candidata para ser empleada como herramienta para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas enfocadas a la captura de carbono.

6.1 Perspectivas

- Identificar la cepa candidata a *Chlorella* mediante métodos moleculares.
- Evaluar termo-tolerancia de la cepa aislada.
- Realizar un escalamiento y optimización para incluir factores como aireación y concentración de CO₂.
- Evaluación de producción de pigmentos por la cepa candidata a *Chlorella*.
- Optimización de la extracción y purificación de la enzima RuBisCO.
- Comparación y caracterización de actividad enzimática por métodos cromatográficos.
- Inmovilización de la enzima y evaluación de su actividad.
- Evaluar aprovechamiento de la cepa para capturar otros gases de efecto invernadero (NO_x y SO_x).
- Evaluar efecto de la luz roja y luz azul para mejorar la producción de biomasa, dado que se ha observado que incrementan la actividad enzimática y la activación de la anhidrasa carbónica.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

- Adebayo, T. S., Awosusi, A. A., Damola Oladipupo, S., Agyekum, E. B., Jayakumar, A., & Kumar, N. M. (2021). Dominance of Fossil Fuels in Japan's National Energy Mix and Implications for Environmental Sustainability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (14): 7347. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147347>
- Adebayo, T. S., Awosusi, A. A., Rjoub, H., Agyekum, E. B., & Kirikkaleli, D. (2022). The influence of renewable energy usage on consumption-based carbon emissions in MINT economies. *Heliyon*, 8(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08941>
- Aguirre, D. E., Moreno, S., & Salcedo, S. M. (2018). Algae species from nuevo leon, mexico: new records for the state. *Polibotánica*, 46. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.1>
- Ajijah, N., Tjandra, B. C., Hamidah, U., Widyarani, & Sintawardani, N. (2020). Utilization of tofu wastewater as a cultivation medium for *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 483(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/483/1/012027>
- Akgül, F., Kizilkaya, İ. T., Akgül, R., & Erduğan, H. (2017). Morphological and molecular characterization of *scenedesmus*-like species from Ergene River Basin (Thrace, Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(3), 609–619. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_3_17
- Alazaiza, M. Y., He, S., Su, D., Abu Amr, S. S., Toh, P. Y., & Bashir, M. J. (2023). Sewage Water Treatment Using *Chlorella Vulgaris* Microalgae for Simultaneous Nutrient Separation and Biomass Production. *Separations*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/separations10040229>
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press
- AOAC International. (2005). AOAC-958.01. AOAC Official Method 958.01 Phosphorus (Total). *AOAC Official Methods of Analysis*, 2, 5-6
- Bachu, S. (2008). CO2 storage in geological media: Role, means, status and barriers to deployment. *Progress in energy and combustion science*, 34(2), 254-273.
- Ballen, M., Hernandez, L., Parra, D., Vega, A., & Perez, K. (2016). Using *Scenedesmus* sp. for the Phycoremediation of Tannery Wastewater. *TECCIENCIA*, 11(21), 69–75. <https://doi.org/10.18180/tecciencia.2016.21.11>
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. En *Algal Research*, 2(4), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>
- Cabrera, J. (2014). Optimización de variables de proceso para la reducción del tiempo de reproceso en el reactor tipo Batch, en la manufactura de adhesivos PU por medio de diseño experimental MSR. [Tesis, Centro de Innovación Aplicada a Tecnologías Competitivas].

Repositorio Intitucional del CIATEC.
<https://ciatec.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1019/111/1/TESIS%20J.%20DE%20JESUS%20CABRERA%20CASTRO.pdf>

- Calvin, M. and Benson, A.A. (1948) The Path of Carbon in Photosynthesis. *Science*, 107, 476-480. <https://doi.org/10.1126/science.107.2784.476>
- Chakrabarti, S., Bhattacharya, S., & Bhattacharya, S. K. (2003). Immobilization of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A step toward carbon dioxide fixation bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(6), 705–711. <https://doi.org/10.1002/bit.10515>
- Cooper TG, Filmer D (1969) The active species of “CO₂” utilized by ribulose diphosphate carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 1081–1083.
- Crafts, S. J., & Salvucci, M. E. (2000). Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13430-13435.
- Daneshvar, E., Wicker, R. J., Show, P.-L., & Bhatnagar, A. (2022). Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO₂ biofixation and biomass valorization-A review. *Chemical Engineering Journal*, 427, 130884. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884>
- Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W., & Pröschold, T. (2015). Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127838>
- Dibenedetto, A., & Nocito, F. (2020). The future of carbon dioxide chemistry. *ChemSusChem*, 13(23), 6219-6228.
- Dorner, R.W., Kahn, A., y Wildman, S.G. 1957. The proteins of green leaves. VII. Synthesis and decay of the cytoplasmic proteins during the life of the tobacco leaf. *J. Biol. Chem.* 229, 945-952.
- Epa, U., & of Science, O. (2002). *Selenastrum capricornutum, Growth Test; Chronic Toxicity. Excerpt from: Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms.* United States Environmental Protection Agency. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method_1003_2002.pdf
- Eppendorf. (2019). *Eppendorf BioSpectrometer ® basic. Manual de instrucciones.* www.eppendorf.com/myeppendorf
- Erb, T. J., & Zarzycki, J. (2018). A short history of RuBisCO: the rise and fall (?) of Nature’s predominant CO₂ fixing enzyme. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 100–107. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2017.07.017>
- Feng, P., Yang, K., Xu, Z., Wang, Z., Fan, L., Qin, L., Zhu, S., Shang, C., Chai, P., Yuan, Z., & Hu, L. (2014). Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology*, 173, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123>

- Fernandes, M. S., Calsing, L. C. G., Nascimento, R. C., Santana, H., Morais, P. B., de Capdeville, G., & Brasil, B. S. A. F. (2019). Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. *Algal Research*, 38. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101402>
- Ferris, J. J., Kobayashi, S., & Clesceri Hudson, N. L. (1974). Growth of *Selenastrum capricornutum* in natural waters augmented with detergent products in wastewaters. *Water Research*, 8.
- Gao, K., Xue, C., Yang, M., Li, L., Qian, P., Gao, Z., Gao, Z., & Deng, X. (2022). Optimization of light intensity and photoperiod for growing *Chlorella sorokiniana* on cooking cocoon wastewater in a bubble-column bioreactor. *Algal Research*, 62, 102612.
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there?. *Journal of Phycology*, 48(5), 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Hagemann, M., & Bauwe, H. (2016). Photorespiration and the potential to improve photosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 35, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.014>
- Jakob, R., & Saenger, W. (1985). Reversed-phase ion-pair Chromatographic separation of ribulose 1,5-bisphosphate from 3-phosphoglycerate and its application as a new enzyme assay for RuBP carboxylase/oxygenase. *FEBS Letters*, 183(1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80965-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80965-0)
- Kato, Y., Oyama, T., Inokuma, K., Vavricka, C. J., Matsuda, M., Hidese, R., Satoh, K., Oono, Y., Chang, J. S., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2021). Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by disruption of microalgae starch debranching enzyme. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01976-8>
- Khajepour, F., Hosseini, S. A., Ghorbani Nasrabadi, R., & Markou, G. (2015). Effect of Light Intensity and Photoperiod on Growth and Biochemical Composition of a Local Isolate of *Nostoc calcicola*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(8), 2279–2289. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1717-9>
- Khaligh, S. F., & Asoodeh, A. (2022). Recent advances in the bio-application of microalgae-derived biochemical metabolites and development trends of photobioreactor-based culture systems. *3 Biotech*, 12(10). <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03327-8>
- Khavari, F., Saidijam, M., Taheri, M., & Nouri, F. (2021). Microalgae: therapeutic potentials and applications. En *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4757–4765. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>
- Kim, H. S., Park, W. K., Lee, B., Seon, G., Suh, W. I., Moon, M., & Chang, Y. K. (2019). Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. HS2 using screening, statistical assessment, and validation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55854-9>
- Koytsoumpa, E. I., Bergins, C., & Kakaras, E. (2018). The CO₂ economy: Review of CO₂ capture and reuse technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, 132, 3-16.
- Krienitz, L., & Bock, C. (2012). Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*, 698(1), 295–326. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1079-z>

- Kwan, P. P., Banerjee, S., Shariff, M., & Md. Yusoff, F. (2021). Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research*, 52(4), 1337–1347. <https://doi.org/10.1111/are.15023>
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO). <https://www.fao.org/3/W3732E/w3732e00.htm>
- Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S., & Nam, P. K. (2014a). Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(2), 333–339. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136178>
- Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S., & Nam, P. K. (2014b). Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(2), 333–339. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136178>
- Lee, Y. R., & Chen, J. J. (2016). Optimization of simultaneous biomass production and nutrient removal by mixotrophic *Chlorella* sp. using response surface methodology. *Water Science and Technology*, 73(7), 1520–1531. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.626>
- Li, G., Xiao, W., Yang, T., & Lyu, T. (2023). Optimization and Process Effect for Microalgae Carbon Dioxide Fixation Technology Applications Based on Carbon Capture: A Comprehensive Review. *Journal of Carbon Research*, 9(1), 35. <https://doi.org/10.3390/c9010035>
- Liang, C., Xiao, W., Hao, H., Xiaoqing, L., Chao, L., Lei, Z., & Fashui, H. (2008). Effect of Mg²⁺ on the structure and function of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biological Trace Element Research*, 121(3), 249–257. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8050-2>
- Lilley, R. M., Ralph, P. J., & Larkum, A. W. D. (2010). The determination of activity of the enzyme Rubisco in cell extracts of the dinoflagellate alga *Symbiodinium* sp. by manganese chemiluminescence and its response to short-term thermal stress of the alga. *Plant, Cell and Environment*, 33(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02121.x>
- Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE. (2023). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (24^o ed). APHA Press.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00538>
- 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). <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186–202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>

- Nukurangi, T. (2017). *Algae ID guides*. National Institute of Water and Atmospheric Research <https://niwa.co.nz/freshwater/management-tools/identification-guides-and-fact-sheets/algae-id-guides>
- Orellana, M. V., & Perry, M. J. (1992). An immunoprobe to measure Rubisco concentrations and maximal photosynthetic rates of individual phytoplankton cells. *Limnology and oceanography*, 37(3), 478-490.
- Philips. (2023). *Lámparas LED Essential*. https://www.lighting.philips.com.mx/api/assets/v1/file/PhilipsLighting/content/fp929002312211-pss-es_mx/Localized_Commercial_Leaflet.pdf.
- Prasad, R., Gupta, S. K., Shabnam, N., Oliveira, C. Y. B., Nema, A. K., Ansari, F. A., & Bux, F. (2021). Role of microalgae in global CO₂ sequestration: Physiological mechanism, recent development, challenges, and future prospective. *Sustainability (Switzerland)*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/su132313061>
- Price G.D., Badger M.R. (1989) Expression of human carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 creates a high CO₂-requiring phenotype: evidence for a central role for carboxysomes in the CO₂ concentrating mechanism. *Plant Physiology*, 91, 505–513
- Raeesossadati, M. J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M. P., & Moheimani, N. R. (2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Research*, 6, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.007>
- Ranade, S. S., & Thiagarajan, P. (2017). Selection of a design for response surface. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(2). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/2/022043>
- Schulze, P. S., Barreira, L. A., Pereira, H. G., Perales, J. A., & Varela, J. C. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 32(8), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (2018). NMX-AA-093-SFCI-2018: Análisis de agua - determinación de la conductividad electrolítica - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2016). NMX-AA-008-SCFI-2016: Análisis de agua - Medición del ph en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2010). NMX-AA-026-SCFI-2010: Análisis de agua - Medición de nitrógeno total kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-028-SCFI-2001: Análisis de agua - Medición de demanda bioquímica de oxígeno (dbo₅) en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-dilución y método de siembra - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2012). NMX-AA-030-SCFI-2012: Análisis de agua -Medición de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.

- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-036-SCFI-2001: Análisis de agua - Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-038-SCFI-2001: Análisis de agua - Determinación de turbiedad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-039-SCFI-2001: Análisis de agua - Determinación de sustancias activas al azul de metileno (saam) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-045-SCFI-2001: Análisis de agua - Determinación de color platino cobalto en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-072-SFCI-2001: Análisis de agua - Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (2001). NMX-AA-073-SCFI-2001: Análisis de agua - Determinación de determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Economía. (1981). NMX-AA-074-1981: Método para la determinación del ion sulfato en aguas naturales y residuales - Método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2021). NOM-001-SEMARNAT-2021. Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. *Diario Oficial de la Federación*.
- Sehgal, A., Goswami, K., Pal, M., Chikkaputtaiah, C., Chetia, P., & Boruah, H. P. D. (2019). Morpho-taxonomic, genetic, and biochemical characterization of freshwater microalgae as potential biodiesel feedstock. *3 Biotech*, 9(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1664-1>
- Servicio Meteorológico Nacional. (2018). Información Estadística Climatológica. CONAGUA. Gobierno de Mexico. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/informacion-estadistica-climatologica>
- Silaen, S., Olfan, W., & Barat, B. (2022). The Effect of Water Quality on Growth of Microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal Of Applied Geospatial Information*, 6, 2022. <http://jurnal.polibatam.ac.id/index.php/JAGI>
- Silva, H. R. da, Silva, F. C. da, Prete, C. E., Hoshino, R. T., Faria, R. T. de, Mantovani, M. S., & Guedes, C. L. (2020). Cryopreservation of *Chlorella vulgaris* Using Different Cryoprotectant Agents. *Journal of Agricultural Science*, 12(7), 75. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n7p75>
- Song, C., Qiu, Y., Li, S., Liu, Z., Chen, G., Sun, L., ... & Kitamura, Y. (2019). A novel concept of bicarbonate-carbon utilization via an absorption-microalgae hybrid process assisted with nutrient recycling from soybean wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 237, 117864.
- Stec, B. (2012). Structural mechanism of RuBisCO activation by carbamylation of the active site lysine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18785–18790. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210754109>

- Subramanian, S., & Sayre, R. T. (2022). The right stuff; realizing the potential for enhanced biomass production in microalgae. En *Frontiers in Energy Research*, 10. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.979747>
- Teuling, E., Schrama, J. W., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2019). Characterizing emulsion properties of microalgal and cyanobacterial protein isolates. *Algal Research*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101471>
- Van Vuuren, S. J. (2006). *Easy identification of the most common freshwater algae: a guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters*. Resource Quality Services (RQS).
- Wagner, J. R., Mount, E. M., & Giles, H. F. (2014). Design of Experiments. *Extrusion*, 291–308. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3481-2.00025-9>
- Weigmann, K. (2019). Fixing carbon. *EMBO reports*, 20(2). <https://doi.org/10.15252/embr.201847580>
- Wildman SG and Bonner J (1947) The proteins of green leaves. Isolation, enzymatic properties and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Arch Biochem*, 14, 381–413
- Yustinadiar, N., Manurung, R., & Suantika, G. (2020). Enhanced biomass productivity of microalgae *Nannochloropsis* sp. in an airlift photobioreactor using low-frequency flashing light with blue LED. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00331-9>
- Zhang, J., Liu, G., Carvajal, A. I., Wilson, R. H., Cai, Z., & Li, Y. (2021). Discovery of a readily heterologously expressed Rubisco from the deep sea with potential for CO₂ capture. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00439-6>
- Zhang, Z., Gao, P., Guo, L., Wang, Y., She, Z., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., & Wang, G. (2020). Elucidating temperature on mixotrophic cultivation of a *Chlorella vulgaris* strain: Different carbon source application and enzyme activity revelation. *Bioresource Technology*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123721>

CAPITULO 8

APÉNDICE

8.1 APÉNDICE 1: MEDIOS UTILIZADOS

BG-11

Componente	Solución Stock (g · L-1 dH2O)	Cantidad usada	Concentración final en medio (M)
<i>Solución Citrato Fe</i>		1 mL	
Ácido cítrico	6	1 mL	3.12×10^{-5}
Citrato de amonio férrico	6	1 mL	$\sim 3 \times 10^{-5}$
NaNO ₃	-	1.5 g	1.76×10^{-2}
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40	1 mL	1.75×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75	1 mL	3.04×10^{-4}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36	1 mL	2.45×10^{-4}
Na ₂ CO ₃	20	1 mL	1.89×10^{-4}
MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	1.0	1 mL	2.79×10^{-6}
<i>Solución de metales traza</i>	(Ver siguiente receta)	1 mL	-

Componente	Solución Stock (g · L-1 dH2O)	Cantidad usada	Concentración final en medio (M)
H ₃ BO ₃	-	2.860 g	4.63×10^{-5}
MnCl ₂ · 4H ₂ O	-	1.810 g	9.15×10^{-6}
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.220 g	7.65×10^{-7}
CuSO ₄ · 5H ₂ O	79.0	1 mL	3.16×10^{-7}
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	-	0.391 g	1.61×10^{-6}
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	49.4	1 mL	1.70×10^{-7}

La preparación del agar con medio BG-11 requiere preparar el medio y agar bacteriológico por separado en concentraciones 2x para cada uno, de modo que puedan ser esterilizados en contenedores independientes y mezclados en condiciones asépticas

antes de su uso, esto se debe a que se ha identificado que, al esterilizarse juntos, se inhibe el crecimiento de las microalgas sembradas (Andersen, 2005).

BBM

Componente	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad usada (por 1 litro de medio)	Concentración final en medio (M)
<i>Macronutrientes</i>			
NaNO ₃	25	10 mL	2.94 x 10 ⁻³
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.5	10 mL	1.70 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5	10 mL	3.04 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.5	10 mL	4.31 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.5	10 mL	1.29 x 10 ⁻³
NaCl ₂	2.5	10 mL	4.28 x 10 ⁻⁴
<i>Solución Alcalina</i>		1 mL	-
<i>EDTA</i>			
EDTA	50	-	1.71 x 10 ⁻⁴
KOH	31	-	5.53 x 10 ⁻⁴
<i>Solución Hierro</i>		1 mL	-
<i>Acidificado</i>			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98	-	1.79 x 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄	-	1 mL	-
<i>Solución de Boro</i>		1 mL	-
H ₃ BO ₃	11.42		1.85 x 10 ⁻⁴
<i>Solución de metales traza</i>		1 mL	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82	-	3.07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44	-	7.28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71	-	4.93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57	-	6.29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49	-	1.68 x 10 ⁻⁶

(Andersen, 2005)
