



CIATEC

EVALUACIÓN DE LA FUENTE DE ILUMINACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MICROALGAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

PRESENTA

Araceli Sarracino Martínez

DIRECTOR: Dr. José Octavio Saucedo Lucero
CODIRECTORA: Dra. Elizabeth Quintana Rodríguez

LEÓN, GUANAJUATO,
Enero, 2025





Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



León, Gto., a 08 de enero de 2025.

Coordinación de Posgrado.
PICYT - CIATEC.
Guanajuato.

Los abajo firmantes miembros del Comité Tutorial de la alumna *Araceli Sarracino Martínez*, una vez leída y revisada la Tesis titulada "*Evaluación de la fuente de iluminación en la producción de compuestos fenólicos en microalgas*", aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestra en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Ingeniería Ambiental durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste se firma la presente a los 8 días del mes de enero del año dos mil veinticinco.

Dr. José Octavio Saucedo Lucero.
Director.

Dra. Elizabeth Quintana Rodríguez.
Co-director.

EG-850-01-F13



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Omega No. 201, Col. Industrial Delta, CP. 37545, León, Gto., México. Tel: +52 (477) 710 0011 www.ciatec.mx



León, Gto., a 17 de enero de 2025.

Dra. Mariana Arce Osuna
Directora General
PICYT - CIATEC
León, Guanajuato.

Estimada Dra. Arce,

Los abajo firmantes miembros del Jurado de Examen de la alumna **Araceli Sarracino Martínez**, una vez leída y revisada la Tesis titulada *"Evaluación de la fuente de iluminación en la producción de compuestos fenólicos en microalgas"*, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestra en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Ingeniería Ambiental durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 17 días del mes de enero del año dos mil veinticinco.

Dr. Domancar Orona Tamayo.
Presidente.

Dra. Nancy Edith Lozoya Pérez.
Secretario.

Dr. José Octavio Saucedo Lucero.
Vocal.

EG-850-01-F14



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Omega No. 201, Col. Industrial Delta, CP. 37545, León, Gto., México. Tel: +52 (477) 710 0011 www.ciatec.mx

Resumen

Las microalgas son una fuente importante de metabolitos de valor agregado y que presentan varias ventajas para la producción de estos mismos. Metabolitos más importantes son los compuestos fenólicos, y en años recientes, la producción de estos compuestos provenientes de microalgas ha tomado un fuerte interés para la comunidad científica. Sin embargo, una limitante en la producción de metabolitos es la fuente de luz necesaria para la fotosíntesis que realizan las microalgas durante su metabolismo. La luz solar es fluctuante durante el año por lo que, en este trabajo, se investigó el efecto de la luz LED sobre la producción de compuestos fenólicos y lípidos en las especies de microalgas *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella vulgaris*. Los resultados indican que la luz solar promueve la acumulación de biomasa para ambas especies, adicionalmente, la luz LED no tiene un efecto significativo en la producción de compuestos fenólicos en las dos especies de microalgas estudiadas. Esto sugiere que este tipo de iluminación no influye en la síntesis de estos compuestos, lo que podría orientar futuras investigaciones hacia otros factores que impacten su producción. Sin embargo, la luz LED resultó tener un gran potencial para reemplazar el uso de luz solar en lugares donde no se tenga acceso a la luz natural.

Palabras clave: Microalgas, Luz LED, compuestos fenólicos.

Abstract

Microalgae are an important source of value-added metabolites and offer several advantages for production over terrestrial plants. In recent years, the production of polyphenols from microalgae has garnered significant interest within the scientific community due to their diverse properties, including antioxidant, antimicrobial, and anti-aging effects. However, one limitation in metabolite production is the light source used, as microalgae are photosynthetic organisms that require appropriate light for their metabolic processes. While sunlight is a natural source, it varies throughout the year. In this study, we investigated the effect of LED light on the production of polyphenols and lipids in the microalgae species *Neochloris oleoabundans* and *Chlorella vulgaris*. Our results indicate that sunlight promotes biomass accumulation in both species. By other side, LED light did not present any differences in polyphenols production compared with sunlight in both species. LED light holds significant promise for the efficient production of these value-added metabolites, helping to mitigate the fluctuations associated with sunlight source in places where it is hard to access to sunlight.

Keywords: Microalgae, LED light, Phenolic compounds.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis de maestría.

En primer lugar, agradezco profundamente a mi asesor de tesis, el Dr. José Octavio Saucedo Lucero, por su paciencia y apoyo durante todo el proceso aprendizaje en el camino de la investigación. Agradezco a la Dra Elizabeth Quintana Rodríguez, coasesora de este trabajo, quien fue una pieza clave en la realización del proyecto, sus conocimientos y consejos han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Agradezco a la Dra. Nancy Edith Lozoya Pérez, por el apoyo, consejos y dedicación invertida en cada explicación al realizar la parte experimental del proyecto.

A mis profesores y compañeros del departamento de Ambiental de la Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas (CIATEC), les agradezco por compartir sus conocimientos y por el ambiente de trabajo tan ameno que siempre se mantuvo en el laboratorio. A mis compañeros de estudios, gracias por su amistad y por los momentos de intercambio académico y personal que enriquecieron esta experiencia.

Agradezco ampliamente a CONAHCYT quien me brindó su apoyo logístico y financiero, por su ayuda y recursos, sin los cuales este proyecto no habría sido posible. Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán por haberme permitido realizar una estancia en sus instalaciones en el departamento de Energía Renovable, especialmente al Dr. Juan Carlos Hernández Chavarría, a la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda y a la Técnico del laboratorio Tanit Toledano Thompson, mis más sinceros agradecimientos.

Un agradecimiento muy especial a mi familia: a mis padres Algeber e Isidra, Ernesto mi hermano, su esposa Mary, y mi pequeña Alondra, por su comprensión y por ser el motor mí de fortaleza, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado. A mi abuela Irma, quien en vida nunca faltó una oración para que lograra esta meta. A mis tíos, Fabiola, Merlín, Álvaro agradezco el apoyo que siempre me han dado a lo largo de mi vida.

Este logro es el resultado del esfuerzo y la colaboración de muchas personas a quienes estoy profundamente agradecida. A todos ustedes, muchas gracias.

Índice general

1 Introducción y Objetivos.....	19
1.1 Antecedentes	19
1.1.1. Efecto de la luz en el crecimiento microalgal	210
1.1.2. Fuentes de luz para el crecimiento de microalgas en fotobiorreactores....	311
1.1.3. Crecimiento microalgal bajo luz LED	411
1.1.4. Metabolitos de interés en microalgas	411
1.2 Definición del problema.....	613
1.3 Justificación.....	714
1.4 Objetivos	915
1.4.1 Objetivo general	915
1.4.2 Objetivos específicos	915
1.5 Hipótesis.....	1015
2 Marco Teórico	1116
2.1 Descripción del marco teórico	1116
2.1.1. Factores de crecimiento.....	1116
2.1.2. Fuente de iluminación	1116
2.1.3. Nutrientes	1418
2.1.4. Temperatura	1620
2.1.5. Fuente de carbono	1821

2.1.6. pH.....	<u>19</u> 22
3 Métodos.....	<u>20</u> 24
3.1 Material biológico	<u>20</u> 24
3.2 Descripción del sistema de biorreactores	<u>20</u> 24
3.3 Condiciones del cultivo.....	<u>24</u> 27
3.4 Cosecha de biomasa	<u>26</u> 28
3.5 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos	<u>26</u> 29
3.6 Análisis de composición elemental CHNS	<u>27</u> 29
3.7 Análisis estadístico.....	<u>27</u> 30
4 Resultados	<u>28</u> 31
4.1 Crecimiento de microalgas.....	<u>28</u> 31
4.2 Compuestos fenólicos	<u>33</u> 35
5 Conclusiones y recomendaciones	<u>35</u> 37
5.1 Conclusiones	<u>35</u> 37
5.2 Recomendaciones.....	<u>36</u> 37
Referencias.....	38

Índice de Figuras

Figura 1. Adaptación de las tapas de aluminio para los biorreactores donde a) horadación de la tapa de aluminio, b) filtro de membrana en la entrada de aire. ...	<u>21</u> 16
Figura 2. Biorreactores en operación sometidos a luz solar. A la izquierda, cultivo de <i>N. oleoabundans</i> , y a la derecha, <i>C. vulgaris</i>	<u>21</u> 17
Figura 3. Caja adaptada para contener los biorreactores sometidos a luz LED.....	<u>22</u> 17
Figura 4. Biorreactores en operación sometidos a iluminación LED. A la izquierda, cultivo de <i>N. oleoabundans</i> , y a la derecha, <i>C. vulgaris</i>	<u>22</u> 18
Figura 5. Sistema de biorreactores en operación, a) Esquema completo del sistema donde 1: Flujo de aire al filtro de carbón activado, 2: Rotámetro, 3: Biorreactores expuestos a luz natural, 4: Biorreactores expuestos a luz LED, Conexiones en biorreactores A: Entrada de aire, B: Puerto de muestreo, C: Respiradero; b) sistema de biorreactores en operación.	<u>23</u> 18
Figura 6. Comportamiento del crecimiento microalgal a dos condiciones de luz y a una $\lambda = 740$ nm.	<u>30</u> 24
Figura 7. Comportamiento del crecimiento microalgal a dos condiciones de luz y a una $\lambda = 680$ nm.	<u>32</u> 26
Figura 8. Variaciones de la intensidad de la luz durante el experimento.....	<u>33</u> 26
Figura 9. Variaciones de la concentración de compuestos fenólicos en función del ciclo de cultivo.	<u>34</u> 27

1.

Introducción y Objetivos

1.1 Antecedentes

Las microalgas son organismos eucariotas unicelulares y fototróficos que producen una gran cantidad de compuestos bioactivos que incluyen lípidos, ácidos grasos, carotenoides y compuestos fenólicos. Estos metabolitos se producen utilizando únicamente luz solar, CO₂, algunos minerales y agua. Microalgas de interés a la biotecnología incluyen los géneros de algas verdes *Chlorella* y *Clamidomonas*. Estos organismos producen cantidades significativas de lípidos de almacenamiento conocidos como triacilglicéridos (TAG), sustancias que pueden ser tratadas químicamente para producir biodiésel.

El cultivo de las microalgas ha tomado gran auge por la producción de biomasa de donde se extraen metabolitos celulares de uso comercial (lípidos, carbohidratos, vitaminas, colorantes, carotenoides y proteínas de alta calidad) que también pueden utilizarse en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética [2] o pueden utilizarse para producir biodiésel, aceite, biosíntesis de gas, biohidrógeno y bioetanol, y tienen un amplio potencial bioenergético [3].

El cultivo de microalgas tiene ciertas ventajas de crecimiento frente a las plantas superiores y uno de ellos es que no se requiere tierra de cultivo, pueden ser aprovechadas los canales de aguas residuales, reduciendo el consumo de agua y proporcionando una cantidad de nutrientes [4]. Entre la amplia gama de especies de microalgas, la característica clave para seleccionar una cepa para la producción de

biodiésel es su alto contenido en lípidos. Sin embargo, esta selección se debe realizar de acuerdo con las características de cada microalga para obtener resultados favorables.

El cultivo de microalgas generalmente se ha llevado a cabo en sistemas abiertos; sin embargo, en los sistemas abiertos es complejo el mantenimiento del cultivo de microalgas, puesto que se mantienen expuestos a mezclarse con otros organismos que pueden afectar su crecimiento. Bajo este criterio se considera que los sistemas cerrados son la mejor opción para el cultivo de microalgas cuando se quiere usar la biomasa para la obtención de metabolitos de alto valor. Los sistemas cerrados presentan algunas ventajas tales como reducir la pérdida de CO₂, evitar la evaporación del agua, permitir mayores concentraciones celulares y reducir el riesgo de contaminación [5]. En el diseño de los biorreactores se deben considerar factores importantes como el pH, la temperatura, el medio de cultivo, la iluminación y la penetración de la luz dentro del reactor [6]. La tasa de crecimiento y la fotosíntesis se ven afectadas por la intensidad de la luz [8]. Dado que las microalgas son fotoautótrofas dependen de una fuente de luz para obtener energía y convertirla en energía química como el trifosfato de adenosina (ATP) y el fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP). Se considera que la luz es el parámetro más importante para el cultivo de microalgas, pues de ello depende el proceso de fotosíntesis y por tanto de la producción de metabolitos de valor agregado (lípidos, ácidos grasos, carotenoides). Por lo cual resulta de interés estudiar el efecto de diferentes espectros de luz sobre el crecimiento de las algas.

1.1.1. Efecto de la luz en el crecimiento microalgal

Las condiciones de luz son los principales factores que afectan la fisiología y un factor importante que afectan la cinética de la fotosíntesis de las microalgas. La cantidad y calidad de la luz determinan la cantidad de energía disponible para la fotosíntesis necesaria para dirigir sus actividades metabólicas [9]. Numerosos estudios con las microalgas de varios grupos sugieren que los pigmentos, los ácidos grasos insaturados, los carbohidratos, y el contenido de proteínas cambian en respuesta al aumento o disminución de la intensidad de la luz [10].

Por otro lado, la intensidad de la luz juega un papel importante y los requisitos varían mucho según la profundidad y la densidad del cultivo de microalgas. Si las microalgas se cultivan a mayores profundidades y concentraciones celulares, se debe aumentar la intensidad de la luz para que penetre a través del cultivo [11].

Para una fotosíntesis adecuada son necesarias variables tales como la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo parámetros importantes de considerar. La baja intensidad de la luz provoca fotolimitación y la mayor intensidad de la luz provoca fotoinhibición. Las microalgas verdes contienen clorofila-a y clorofila-b en una proporción de 3:1. La clorofila-a tiene dos picos de absorción, es decir, uno a 430 nm (luz azul/violeta) y otro a 660 nm (luz roja intensa). La clorofila-b tiene un pico de absorción a 460 nm de luz azul y el otro a 630 nm de luz roja [12]. Esto implica que se debe elegir la luz de la longitud de onda correcta dependiendo de los pigmentos que posean las algas. Aunque el fotoperíodo varía de un organismo a otro, se considera que 12-15 h de iluminación es el período óptimo [13].

1.1.2. Fuentes de luz para el crecimiento de microalgas en fotobiorreactores

De acuerdo con [14], las fuentes de luz para el crecimiento de microalgas son:

1.1.2.1. Luz solar

La luz solar es la fuente natural de luz que tiene el espectro perfecto (espectro visible) para el crecimiento de las algas.

1.1.2.2. Lámparas fluorescentes

Fotobiorreactores utilizan lámparas fluorescentes que emiten un espectro de luz azul o rojo.

1.1.2.3. Diodo emisor de luz (LED)

El LED emite luz monocromática con colores muy saturados. Convierte eficientemente la energía eléctrica en luz sin desperdiciar mucha energía en forma de

calor. Solo suministra las longitudes de onda de luz que son más útiles para el crecimiento microalgas.

1.1.3. Crecimiento microalgal bajo luz LED

Diversos estudios han demostrado que el crecimiento microalgal bajo luz LED genera curvas de crecimiento similares a las generadas a través de otras fuentes de luz, a diversas longitudes de onda y de concentraciones celulares [15-18].

1.1.4. Metabolitos de interés en microalgas

Las microalgas producen una cantidad notable de diversas biomoléculas, entre ellas metabolitos de alto valor para su aplicación en diversas industrias. Estos microorganismos pueden producir ácidos grasos, pigmentos, compuestos fenólicos, proteínas, entre otros de gran interés para la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica y energética [19].

De los diversos metabolitos, los compuestos fenólicos son moléculas asociadas a la reducción de estrés oxidativo y radicales libres. Los compuestos fenólicos son moléculas formadas por uno o varios anillos aromáticos, entre estos compuestos se encuentran flavonoides, isoflavonas, lignanos y polímeros fenólicos, tales como proantocianidinas y taninos [20].

Los ácidos fenólicos intervienen en estrategias de defensa o absorción de nutrientes en las plantas [21]. En la salud humana, están relacionados con la modulación de los procesos inflamatorios, regulan la digestión de macronutrientes y tiene efectos prebióticos sobre el microbiota intestinal [22].

En las microalgas, los compuestos fenólicos actúan para prevenir el daño celular causado por los radicales libres, como en eventos de alta intensidad de luz [23]. Entre los compuestos fenólicos que se encuentran en las microalgas se encuentran el ácido cafeico, el ácido ferúlico, y el ácido p-cumárico [24]. La microalga *Spirulina platensis*

ha sido reportada por su alto contenido en fenólicos (0.33 mg eq. de ácido gálico g⁻¹), entre ellos ácido cafeico, ácido sirínico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico y apigenina, este último conocido por su actividad antiviral [25]. Estos compuestos también han sido reportados en reportaron en la literatura por estar presentes en las microalgas *Tetraselmis suecica*, *Botryococcus braunii*, *Neochloris oleoabundans*, *Isochrysis sp.*, *C. vulgaris* y *P. tricornutum*. La producción de compuestos fenólicos está regulada por factores ambientales como salinidad, pH, temperatura, radiación UV y disponibilidad de luz o nutrientes, así como por inductores químicos.

1.2 Definición del problema

Las biomasas de microalgas son ricas en diferentes tipos de metabolitos de alto valor agregado como pigmentos, antioxidantes, ácidos grasos. Estas biomoléculas tienen un potencial uso en diversas industrias como lo son: alimentarias, farmacéuticas, cosméticas y nutraceuticas. Sus potenciales usos refuerzan la producción a gran escala de microalgas en biorreactores. El biorreactor proporciona un entorno controlado de todos los parámetros ayudando al crecimiento eficiente en un corto período de tiempo. Sin embargo, estos biorreactores utilizan diferentes fuentes de luz como la luz solar, lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes. Hoy en día, los diodos emisores de luz (LED) están captando más atención como una de las fuentes de luz en los biorreactores debido a su espectro de emisión y a ventajas, como su tamaño pequeño, peso ligero, durabilidad y eficiencia en términos de vida útil más larga. La cantidad de luz emitida es mucho mayor en comparación con su consumo de energía. Este trabajo aborda el uso de LED en fotobiorreactores para el crecimiento de microalgas y la producción de compuestos de alto valor agregado como los son los compuestos fenólicos.

1.3 Justificación

Las microalgas representan un punto de vista ambiental muy alentador, porque producen metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos que pueden ser aprovechados en la fabricación de diferentes productos de uso farmacéutico y cosmético. Sin embargo, la fuente de iluminación y la intensidad de esta representan el factor más importante en el cultivo de microalgas y la obtención de compuestos fenólicos. Se ha revisado que la frecuencia en la intensidad mejora ampliamente el crecimiento microalgal y los metabolitos que esta produce [26].

Estudios previos han demostrado que la luz artificial proporciona una mejor regulación de la intensidad, la duración y los espectros de luz en comparación con el uso de luz natural, lo que mejora ampliamente el crecimiento microalgal y sus metabolitos, sobre todo aquellos con valor agregado. Sin embargo, el uso de fuentes de luz artificial tiene un coste elevado, ya que normalmente se trata de lámparas fluorescentes, luces incandescentes o halógenas que tienen un amplio espectro de emisión. Por lo anterior, se ha propuesto el uso de diodos emisores de luz (LED) los cuales tienen las ventajas de un tamaño más pequeño que les permite adaptarse al cultivo de microalgas en interiores, un tiempo de vida útil mayor, alta eficiencia de conversión, tolerancia para encender y apagar continuamente y una menor disipación de calor. Una tarea urgente en el cultivo de microalgas es minimizar los costos derivados a la iluminación, ya que determinan en gran medida el costo de los compuestos obtenidos de microalgas, por lo cual los LED representan una alternativa viable para su uso en el cultivo microalgal.

Sin embargo, la mayoría de los reportes de microalgas con luces monocromáticas se ha llevado a cabo para estudiar el proceso fotosintético más que su efecto sobre el crecimiento y la acumulación de metabolitos de interés. Recientemente se han

realizado pocos trabajos sobre la influencia de diferentes espectros utilizando luces LED en la productividad y la acumulación de lípidos. Con ello en mente, y teniendo desarrollo científico previo donde se ha investigado respecto a la diferencia en la producción a partir de las microalgas *N. oleoabundans* y *C. vulgaris* iluminadas con luz solar y LED.

En esta tesis se propone explorar específicamente el impacto de la luz solar y los LED como fuente de iluminación en la producción de compuestos fenólicos en microalgas, con el objetivo de identificar estrategias óptimas para mejorar la calidad y cantidad de estos compuestos clave. El cultivo de microalgas bajo diferentes condiciones de iluminación ofrece una oportunidad única para entender cómo este factor ambiental fundamental influye en la biosíntesis de compuestos fenólicos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar las diferencias que existen en el cultivo de las microalgas *N. oleoabundans* y *C. vulgaris* cuando están expuestas a fuentes de iluminación LED y luz del sol.

1.4.2 Objetivos específicos

- Diseñar un sistema de cultivo semibatch que permita la recolección de biomasa por diferentes periodos
- Evaluar el crecimiento de las cepas de las microalgas *N. oleoabundans* y *C. vulgaris* a exposición de iluminación LED y luz solar.
- Evaluar la producción de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu bajo dos condiciones de luz.

1.5 Hipótesis

- El uso de iluminación LED tendrá un efecto significativo en la concentración de biomasa medida como densidad óptica, para ambas especies de microalga *N. oleoabundans* y *C. vulgaris*, en comparación con la exposición a luz solar natural.
- La longitud de onda de la luz LED provoca una diferencia significativa en la producción de biomasa de las dos especies de microalgas.
- La exposición a luz artificial de tipo LED tendrá un efecto significativo en la producción de compuestos fenólicos para las especies de microalga *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella vulgaris*, en comparación con la exposición a luz solar natural.

2.

Marco Teórico

2.1 Descripción del marco teórico

Las microalgas son organismos celulares eucariotas con un tamaño que oscila entre unos pocos μm y 200 μm , y son capaces de producir alrededor del 50% de todo el O_2 de la Tierra mediante fotosíntesis [27]. Las microalgas se han adaptado de forma única a hábitats extremos a lo largo de miles de millones de años de evolución [28]. Presentan una clasificación que va de acuerdo a su pigmentación [29]: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Cyanophyceae* (algas verde-azuladas), *Chrysophyceae* (algas doradas), *Rhodophyceae* (algas rojas), *Phaeophyceae* (algas pardas) y *Bacillariophyceae* (diatomeas); todas tienen un amplio rango de moléculas orgánicas que son ampliamente usados.

2.1.1. Factores de crecimiento

El crecimiento de las microalgas requiere una cantidad de luz solar, agua (salada o dulce, según el tipo de microalgas) y nutrientes como CO_2 , Nitrógeno y fósforo [30].

2.1.2. Fuente de iluminación

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual los organismos fotoautótrofos captan la luz solar de forma eficiente y la convierten en moléculas orgánicas y biomasa con una eficiencia que es variable, dependiendo de las especies y de las condiciones ambientales [31].

La luz, un componente esencial para la fotosíntesis, se presenta en una gama diversa de longitudes de onda, y cada tipo de luz puede afectar de manera única el crecimiento

de las microalgas. Un aspecto clave a considerar es la capacidad de las microalgas para absorber la luz a través de los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila. Estos pigmentos poseen máximos de absorción en diferentes regiones del espectro, lo que implica que las microalgas pueden responder de manera diferente a diversas fuentes de luz. La luz solar, con su espectro completo, ha sido la fuente de energía predominante para las microalgas en su entorno natural. Sin embargo, cuando se cultivan en entornos controlados, la exposición a la luz solar directa puede no ser la opción más eficiente. La intensidad y la duración de la luz solar pueden variar significativamente, lo que podría resultar en fluctuaciones en el crecimiento microalgal. No obstante, la luz solar natural es rica en diversidad espectral, proporcionando a las microalgas la oportunidad de utilizar diferentes longitudes de onda para la fotosíntesis. El uso de iluminación LED ha ganado popularidad en la investigación y producción de microalgas debido a su capacidad para proporcionar luz de espectros específicos. Al ajustar la combinación de colores, es posible personalizar la fuente de luz para maximizar la eficiencia fotosintética y, por ende, el crecimiento microalgal. Investigaciones han demostrado que la iluminación LED puede mejorar la productividad y la calidad de las microalgas al proporcionar una fuente de luz más controlada [32,35].

La luz es considerada el factor principal debido a que la duración y la intensidad de la luz afectan directamente a la fotosíntesis de las microalgas e influyen en su composición bioquímica y en el rendimiento de biomasa [27]. La luz que usan las microalgas es la luz visible del espectro en el intervalo de longitudes de onda 400-700 nm y se denomina radiación fotosintéticamente activa [33]. En este rango, los pigmentos como las clorofilas, los carotenoides y las ficobiliproteínas, absorben la luz [34], afectando directamente el metabolismo de las microalgas mixótrofas, capaces de combinar tipos de nutrición autótrofa y heterótrofa, así como la fotoheterótrofa [35].

El cultivo de las microalgas puede llevarse a cabo con luz natural o luz artificial, en este caso dependerá mucho de la intensidad lumínica que le llegue al cultivo para que se obtenga un buen resultado en el rendimiento de biomasa. Respecto a la fuente de

iluminación se deben de considerar dos factores de la fuente, la intensidad luminosa, la duración de la iluminación y el uso de rayos de diferente composición espectral para un mejor aprovechamiento [36].

Una iluminación baja puede tener un efecto limitante sobre el crecimiento de las microalgas, y una iluminación demasiado alta puede tener uno [37]. Esto es, bajo luz excesiva puede conducir a daños fotooxidativos en el aparato fotosintético y a la disminución de la eficiencia y la tasa de fotosíntesis; es decir, a la fotoinhibición [4]. Por otro lado, es indispensable considerar las longitudes de onda para el crecimiento de las microalgas. Las longitudes de onda roja y azul de la luz con una cantidad adecuada de densidad de flujo de fotones conducen a una concentración máxima de biomasa [38].

Por su parte, el contenido de pigmentos como la clorofila afectan directamente la absorción de la región fotosintéticamente activa [39]. La clorofila-a y la clorofila-b absorben fácilmente la energía suministrada por la luz roja y sus electrones se elevan al primer estado de excitación en el complejo captador de luz. En comparación con la luz roja, la luz azul tiene un 40% más de energía y una longitud de onda más corta. Debido a esto, la luz azul eleva los electrones a su segundo estado de excitación en el complejo captador de luz desde donde vuelven al estado de fundamental después de transferir energía a los componentes descendentes de los fotosistemas (PS) I y II. Los LED azules desempeñan un papel vital en la regulación del crecimiento y el metabolismo celular [40]. Los LED verdes tienen las características que emiten aproximadamente tres veces menos fotones que los rojos, de acuerdo con esto, los valores sugieren que los LED rojos ayudan en la producción de biomasa de manera más rápida [41].

En condiciones de poca luz ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), las microalgas tienden a sobreacumular clorofila en capas empaquetadas de células que lleva al autosombreado y reducir aún más el paso de la luz; por otro lado cuando se exponen los cultivos de microalgas a intensidades de luz de 300 a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, las células de microalgas tardan más en

aclimatarse y en muchas ocasiones son llevadas a la fotoinhibición provocando estrés lumínico, lo cual indica una disminución en la clorofila y maximizando la capacidad de fijación de CO₂ [42].

2.1.3. Nutrientes

Por lo general, la producción de compuestos fenólicos está relacionada con la disponibilidad y la calidad de las fuentes de nitrógeno durante el proceso de cultivo de las microalgas. La importancia de la fuente de nitrógeno comienza porque es componente fundamental de las proteínas y desempeña un papel vital en el crecimiento celular y, por ende, en la síntesis de diferentes compuestos. La mención de que el nitrógeno puede representar entre el 7 y el 20% del peso corporal celular remarca la importancia cuantitativa de este nutriente en el contexto de las microalgas [43].

En un estudio donde se observaron fases de suministro de nitrógeno se revelan aspectos cruciales para la optimización de la producción de fucoxantina, un pigmento muy importante en las microalgas. Esta valiosa investigación, centrada en el cultivo por lotes de *Tisochrysis lutea*, proporciona una perspectiva esclarecedora sobre la dinámica de este proceso y su relación directa con la síntesis de fucoxantina. La observación de dos fases claramente definidas, la fase de suministro de nitrógeno y la fase de inanición de nitrógeno, revela la respuesta de las microalgas a la disponibilidad de este macronutriente esencial. En los tres primeros días de crecimiento exponencial, característico de la fase de suministro de nitrógeno, se registra un aumento impresionante del 91.7% en el contenido de fucoxantina. Este incremento sugiere una conexión directa entre la disponibilidad de nitrógeno y la capacidad de las microalgas para sintetizar este valioso compuesto. Sin embargo, la transición a la fase de inanición de nitrógeno revela una disminución significativa del contenido de fucoxantina, llegando a una reducción del 52.9% después de tres días. Este declive evidencia la dependencia directa entre la fucoxantina y las condiciones nutricionales específicas durante las fases cruciales del ciclo de crecimiento de las microalgas. La comprensión de esta dinámica no solo es esencial para la producción eficiente de fucoxantina, sino

que también proporciona una visión más profunda de los mecanismos fisiológicos de las microalgas en respuesta a las variaciones en el suministro de nitrógeno. Al utilizar dos unidades de concentración de nitrógeno distintas, milimolar y gramo por litro, se logra un análisis más detallado de cómo las microalgas responden a variaciones en la disponibilidad de nitrógeno. En particular, se destaca que una concentración elevada de nitrógeno (300 mg L^{-1}) potencia tanto el crecimiento de la biomasa como el número de células en la mayoría de las microalgas productoras de fucoxantina [44].

Los cultivos de microalgas requieren macronutrientes esenciales, vitaminas y oligoelementos en cantidades adecuadas y en formas químicas biodisponibles. Se podría decir que la columna vertebral de los nutrientes que necesitan las microalgas son $\text{C}_1\text{H}_{1.7}\text{O}_{0.4}\text{N}_{0.15}\text{P}_{0.0094}$ donde las cantidades de nitrógeno disponibles en el cultivo alteran directamente el crecimiento celular [27]. Los micronutrientes Mo, K, Co, Fe, Mg, Mn, B y Zn solo se necesitan en cantidades mínimas, pero tienen un fuerte efecto antioxidante [45].

En general, el nitrógeno y el fósforo inorgánicos se absorben en forma de nitratos y fosfatos. La urea también es una fuente adecuada y una alternativa rentable a otras fuentes de nitrógeno inorgánico. El carbono puede añadirse al cultivo de algas en forma orgánica, como glicerol o acetatos, o como CO_2 . Sin embargo, para el cultivo de microalgas a gran escala, debe utilizarse CO_2 ambiental como fuente de carbono, que no solo es de bajo costo, sino que añade el beneficio de la mitigación del CO_2 . El P, el N y el C son los principales nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento de las microalgas [27]. La carencia de nutrientes afecta en gran medida a la tasa de crecimiento de las microalgas y da lugar a una baja biomasa [46] por lo que se ve afectado la síntesis y acumulación de carbohidratos y lípidos en las microalgas [47]. Cuando la biomasa se quiere usar para uso comercial o la obtención de moléculas es importante considerar la importancia de las fuentes de nutrientes para obtener mejores resultados.

2.1.4. Temperatura

La temperatura, un factor ambiental de suma importancia, ejerce una influencia crucial en el desarrollo de microalgas, desencadenando una serie de respuestas que afectan su tasa de crecimiento, tamaño celular, composición bioquímica y requisitos nutricionales. Esta compleja relación entre las microalgas y la temperatura se convierte en un componente esencial para comprender y optimizar la producción de compuestos bioactivos. Sin embargo, las microalgas tienen capacidad para adaptarse a distintos rangos de temperatura. Normalmente, el crecimiento de diferentes microalgas tiene lugar en un rango de temperatura de 20 y 30 °C [48].

Cada especie tiene su propio rango óptimo de temperatura de crecimiento por lo que es posible clasificar las algas como psicrófilas (<15 °C), mesófilas (<50 °C) y termófilas (> 50 °C) [29]. La temperatura máxima que se ha reportado para las algas eucariotas es de 62 °C [49]. Aumentar la temperatura hasta el rango óptimo incrementa exponencialmente el crecimiento de las algas, pero un aumento o disminución de la temperatura más allá del punto óptimo retrasa o incluso detiene el crecimiento y la actividad de las algas [50], porque la temperatura está relacionada con la fijación del carbono. En efecto, las temperaturas más elevadas favorecen la absorción y la fijación de CO₂, pero representan un factor inhibidor del metabolismo respiratorio y de las proteínas fotosintéticas ya que perturban el equilibrio energético de las células [29]. La actividad de fijación de CO₂ de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo) se ve afectada por el aumento de la temperatura hasta un cierto nivel y luego disminuye [51]. Además, una temperatura más elevada también reduce el tamaño celular y la respiración [27].

Al igual que con la salinidad, la temperatura óptima para cada microalga se revela como un factor determinante para maximizar cualquier bioproceso. Un estudio aplicando la metodología de superficie de respuesta ha proporcionado valiosos datos sobre la temperatura óptima para *T. lutea*, demostrando que 25 °C es la temperatura ideal para lograr el máximo contenido de fucoxantina [52].

Este hallazgo destaca las necesidades de cada microalga remarcando la importancia de personalizar las condiciones de cultivo para maximizar los resultados deseados. Por otro lado, un estudio adicional sobre *T. lutea* remarca que, entre varias temperaturas evaluadas (16.5, 20, 25 y 30 °C), la microalga favoreció una temperatura de 30 °C. Esta condición termal resultó en la máxima concentración de biomasa (1.81 g L⁻¹) y un contenido de fucoxantina significativo, aproximadamente el 0.21% del peso seco [44]. Este resultado pone de manifiesto la plasticidad de las microalgas para adaptarse a condiciones térmicas específicas, lo que puede tener consecuencias directas en la productividad y calidad de los compuestos deseados. Un aspecto interesante observado en este estudio fue el mayor diámetro celular a temperaturas más bajas (16.5 °C) en comparación con temperaturas más altas (30 °C). Este fenómeno se asoció con la acumulación de lípidos intracelulares, sugiriendo que el tamaño celular puede ser una respuesta adaptativa a las temperaturas. Estas observaciones señalan a la complejidad de las interacciones entre la temperatura y los procesos biológicos en las microalgas, y destaca la necesidad de entender no solo los efectos en la producción de fucoxantina, sino también en la fisiología celular. El contenido de lípidos aumenta de 5.9 a 14.7% con la disminución de la temperatura de 30 a 25 °C, mientras que la tasa de crecimiento se mantiene intacta [53].

En resumen, establecer la temperatura óptima para las microalgas se vuelve crucial para alcanzar un crecimiento y contenido de moléculas orgánicas, especialmente considerando su comercialización. Este enfoque de optimización basado en la temperatura es esencial para el creciente campo de la biotecnología de microalgas, proporcionando conocimientos valiosos sobre cómo modular las condiciones ambientales para mejorar la producción de compuestos bioactivos.

2.1.5. Fuente de carbono

Las microalgas fotoautótrofas se posicionan como agentes cruciales en la fijación de dióxido de carbono, ejecutando un papel esencial en la fotosíntesis. Este proceso no solo sustenta su propio crecimiento, sino que también incide directamente en la acumulación de fucoxantina. El carbono es el principal elemento de la biomasa microalgal ya que representa el 65% del peso seco, pero en algunas especies y condiciones de cultivo no supera el 18% [29]. Sin embargo, su aumento está estrictamente vinculado con la limitación de nutrientes como el N y el P. El carbono inorgánico se fija en el interior de las células microalgales a través del ciclo de Calvin [54].

La hidratación del CO_2 para formar HCO_3^- , que es fácilmente utilizado por las microalgas, es un proceso extremadamente lento [55]. Por otro lado, el pH y la temperatura influyen en la disolución del CO_2 , si no existe un pH y temperatura adecuado la disolución del CO_2 se vuelve lenta [34], esto llega a producir una desgasificación en el medio de cultivo, provocando un rendimiento de biomasa muy bajo, un método efectivo para solucionar la demanda de CO_2 en el medio de cultivo es el uso de reactores continuos [55]. El pH y el CO_2 son factores que están relacionados debido a que el pH del cultivo aumenta con el tiempo, la especie CO_3^{2-} se vuelve dominante por encima del pH 8.5, y no es asimilada favorablemente por las microalgas, lo que provoca una reducción del crecimiento. El estudio realizado por McClure y colaboradores [56] arroja luz sobre el complejo equilibrio entre la concentración de CO_2 , el crecimiento microalgal y la producción de moléculas orgánicas. La investigación se centró en *P. tricornutum*, analizando tres concentraciones diferentes de dióxido de carbono (0.1 y 2%). Los resultados revelaron una dinámica compleja: a medida que la concentración de dióxido de carbono aumentaba, la concentración de biomasa disminuía. Este fenómeno alcanzó su punto máximo con una concentración del 2%, que provocó una disminución del 62.2% en la concentración celular en comparación con las muestras sin CO_2 . Sin embargo, en un giro inesperado, la mayor concentración de biomasa (0.45 g L^{-1}) se obtuvo en ausencia de CO_2 . Este hallazgo

plantea interrogantes sobre el papel del CO₂ y sus implicaciones en la acidificación del medio, evidenciado por la reducción del pH a 6.9 con una concentración del 2%.

2.1.6. pH

Al cultivar microalgas es importante tener en cuenta el pH ya que afecta a diferentes procesos celulares, al metabolismo energético, a las proteínas, y la estructura y función de los orgánulos celulares, entre otros [57].

El pH es un factor operativo básico que impulsa el crecimiento microalgal ya que el pH afecta al proceso fotosintético, a la presencia de disponibilidad de nutrientes inorgánicos a través de la especiación de carbono y metales, a la tasa de producción de lípidos y a las actividades enzimáticas dentro de la célula [58], la mayoría crece favorablemente en el rango de pH de 6 a 8.8 [27]. El medio de cultivo de las algas se mantiene inicialmente a pH neutro en el momento de la inoculación, como las especies carbonatadas del medio están reguladas por el pH [59]. El rango óptimo de pH oscila entre 7.5 y 8.5 para el crecimiento de microalgas que varía según la cepa. El pH del medio de cultivo de las microalgas aumenta constantemente durante el día debido a la utilización de carbono inorgánico. Sin embargo, un pH extremo del sistema de cultivo dificulta la disponibilidad de CO₂ y, por lo tanto, dificulta el crecimiento microalgal [60]. Si el pH aumenta hasta 9.5, la cantidad de clorofila en las microalgas disminuye. Las diferentes especies de microalgas tienen diferentes pH y salinidad óptimos [61]. Al variar el pH del medio, la fotosíntesis se ve afectada lo que repercute en la tasa de crecimiento de las microalgas [62]. Cuando se disuelve en agua, el CO₂ se convierte en ácido carbónico, lo que aumenta el pH y el medio se vuelve más alcalino. Mientras que el consumo de amonio libera hidrógeno que disminuye el pH y el medio se vuelve más ácido [63]. Por lo anterior, es necesario controlar cuidadosamente el pH durante el cultivo de las microalgas. Si no se mantiene un pH óptimo puede producirse un colapso completo del cultivo debido a la alteración de muchos procesos celulares [60].

3.

Métodos

3.1 Material biológico

Se estudiaron dos especies diferentes de microalgas, la cepa de la microalga *N. oleoabundans* UTEX 1185 fue proporcionada por el Dr. Edmundo Lozoya Gloria del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Por su parte, la cepa de la especie *C. vulgaris* fue donada por la Dra. Varinia López Ramírez del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato.

3.2 Descripción del sistema de biorreactores

El sistema está conformado de cuatro biorreactores que constan de frascos de cristal, cada uno de aproximadamente 1.5 L de volumen. Dos biorreactores son sometidos a luz solar mientras que los otros dos a luz artificial LED. A cada biorreactor se le adaptó una tapa de aluminio que fue perforada con tres orificios: uno para la entrada de aire, el segundo para la salida de aire, y el tercero para la toma de muestra líquida. El aire se alimentó al sistema empleando un compresor de aire, previo paso por un filtro de carbono. Antes de ingresar a los biorreactores, el aire es pasado por un filtro de membrana Whatman de 0.20 μm (**Figura 1**).

a)

b)



Figura 1. Adaptación de las tapas de aluminio para los biorreactores donde a) horadación de la tapa de aluminio, b) filtro de membrana en la entrada de aire.

Los dos biorreactores sometidos a la luz solar fueron colocados en una mesa contigua a una ventana translúcida (**Figura 2**).



Figura 2. Biorreactores en operación sometidos a luz solar. A la izquierda, cultivo de *N. oleoabundans*, y a la derecha, *C. vulgaris*.

Por su parte, para controlar la iluminación artificial LED en los otros dos biorreactores, estos se instalaron dentro de una caja de madera que contenía series de luces LED (**Figura 3**). En la **Figura 4** se muestran los biorreactores operando con iluminación LED.



Figura 3. Caja adaptada para contener los biorreactores sometidos a luz LED.



Figura 4. Biorreactores en operación sometidos a iluminación LED. A la izquierda, cultivo de *N. oleoabundans*, y a la derecha, *C. vulgaris*.

Por su parte, en la **Figura 5** se presenta el esquema del sistema de biorreactores mostrando los componentes más importantes: *i*) Filtro de carbón activado para el aire suministrado proveniente de un compresor para la aireación del medio, *ii*) rotámetro para medición del flujo volumétrico de aire, *iii*) biorreactores expuestos a luz natural, *iv*) biorreactores expuestos a luz LED.

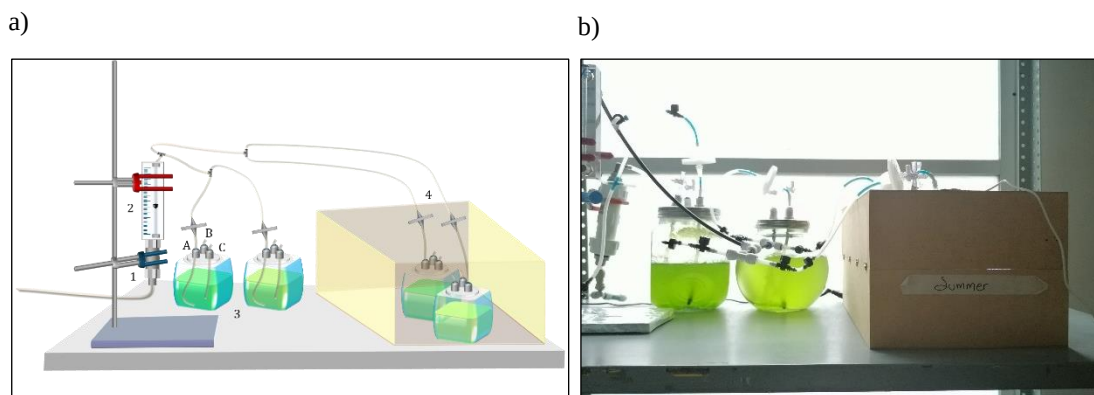


Figura 5. Sistema de biorreactores en operación, a) Esquema completo del sistema donde 1: Flujo de aire al filtro de carbón activado, 2: Rotámetro, 3: Biorreactores expuestos a luz natural, 4: Biorreactores expuestos a luz LED, Conexiones en biorreactores A: Entrada de aire, B: Puerto de muestreo, C: Respiradero; b) Sistema de biorreactores en operación.

3.3 Condiciones del cultivo

El Medio Basal Bold (MBB) es un medio de crecimiento para algas de agua dulce y fue usado para el cultivo de las especies de microalgas analizadas en este estudio. Para la preparación del medio, se pesaron las cantidades de cada una de las sales descritas en la **Tabla 1** necesarias para preparar 1 litro de solución MBB a 100x. En total, se prepararon 25 L de medio de cultivo para tener suficiente reserva del medio y se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 3.5 °C. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo cada 15 días al momento de realizar un cambio de medio de cultivo en los biorreactores [64].

Tabla 1. Cantidades de cada especie para preparar un litro de MBB a 100x

Fórmula química	Nombre de la especie química	Masa (g)
K_2HPO_4	Fosfato monoácido de potasio	3.000
KH_2PO_4	Fosfato diácido de potasio	7.000
$NaNO_3$	Nitrato de sodio	4.000
$NaCl$	Cloruro de sodio	1.000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	3.000
H_3BO_3	Ácido Bórico	0.456
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	2.000
KOH	Hidróxido de potasio	1.240
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Cloruro manganoso tetrahidratado	0.057
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Molibdato de sodio dihidratado	0.047
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.016
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de cinc heptahidratado	0.353
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.063
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato ferroso heptahidratado	0.199
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloruro de calcio dihidratado	1.000
H_2SO_4	Ácido sulfúrico	0.100 (mL)

Para la preparación del medio de cultivo, se inocularon los cuatro biorreactores con 10 mL de cultivo de microalgas, en 990 mL de medio MBB. Como resultado, el medio de cultivo preparado de *C. vulgaris* registró una concentración inicial de 0.004 g L^{-1} , mientras que el medio preparado de *N. oleoabundans* registró una concentración de 2.9 g L^{-1} .

La concentración de las células de microalgas fue medida por medio de densidad óptica (g L^{-1}). La densidad óptica se midió a dos diferentes longitudes de onda (λ): 540 nm y 680 nm, para ambos sistemas de biorreactores.

El procedimiento de muestreo fue el siguiente: se tomaron 10 mL de muestra de cada reactor por medio de una jeringa desde el puerto de muestreo (**Figura 5**). Las muestras se tomaron por triplicado de cada uno de los cuatro biorreactores tres veces al día, procurando ser en el mismo horario (8:00 horas, 12:00 horas y 15:00 horas). En total, cada día se tomaron 36 muestras y los resultados de las mediciones de densidad óptica se promediaron por día para cada cepa de microalga y a diferente tipo de luz.

Las microalgas fueron cultivadas por 150 días comenzando a finales del mes de abril de 2022 hasta el mes de agosto del mismo año, obteniéndose 1800 muestras con sus respectivos triplicados.

En este experimento no hubo un control de temperatura, la temperatura usada para el crecimiento fue temperatura ambiente. Por su parte, para la aireación del medio en cada biorreactor se empleó un flujo de aire de $80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Además, debido a las variaciones durante el día, la intensidad de la luz natural se midió a través de un luxómetro tres veces al día (8:00 h, 12:00 h y 15:00 h). En contraparte, para el caso de los biorreactores sujetos a luz LED, la intensidad de la luz fue constante.

3.4 Cosecha de biomasa

Durante el periodo de 150 días de experimentación, se cosechó 1 litro de medio de cultivo de cada biorreactor en ciclos con una duración de 15 días. Las muestras de medio de cultivo se centrifugaron en varios tubos Falcon por 10 min a 5000 rpm. Después de cada centrifugación, la biomasa centrifugada se sometió a un lavado con agua desionizada. Este procedimiento de centrifugación y lavado es necesario para disminuir la concentración elevada de sales del medio MBB por lo que se repite varias veces hasta que el sobrenadante luce significativamente claro. Finalmente, la biomasa fue almacenada en los tubos Falcon durante 24 horas a una temperatura de -40 °C. Una vez congeladas las muestras fueron llevadas a liofilización durante 12 horas.

3.5 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

Para extraer los compuestos fenólicos, 50 mg de la biomasa previamente liofilizada y pesada fue diluida en 500 µL de metanol (CH_3OH), se aisló de la luz y se dejó incubando en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 24 horas las muestras fueron retiradas de la agitación y se llevaron a centrifugación por 15 min a 12000 rpm, se recuperó el extracto fenólico en tubos eppendorf [65].

Para la cuantificación de extractos fenólicos se realizó por el método Folin-Cilcateu. En una placa de 96 pocillos se colocó una mezcla de agua, carbonato de sodio, muestra, y reactivo Folin, se dejó reaccionar por 15 min. Además, se utilizó como blanco un pocillo que contenía 70% de metanol y las concentraciones se compararon con una curva de calibración de ácido gálico como curva de referencia. Posteriormente la placa

se midió a 760 nm [65]. Los compuestos fenólicos obtenidos se reportan como mg de equivalentes de ácido gálico por g de muestra.

3.6 Análisis de composición elemental CHNS

Para el análisis elemental primero se recolectó biomasa de los cultivos de los 4 reactores de las microalgas, se secó por liofilización y se pesaron 20 mg de cada muestra de biomasa. Para hacer un blanco se pesaron 2 mg de 2,5-Bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-yl) tiofeno (BBOT) y 8 mg de V_2O_5 donde el BBOT tuvo la función de muestra. Para medir las muestras de biomasa se pesaron 2 mg de la muestra de biomasa seca y 8 mg de V_2O_5 en una cápsula de aluminio para colocarla en el analizador CNHS, la biomasa restante se llevó a un horno a 100 °C para realizarle análisis de cenizas. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado [66].

3.7 Análisis estadístico

Las muestras fueron analizadas por triplicado, cada réplica del experimento fue un biorreactor. Los resultados fueron analizados a través del método de Fisher y pruebas de factores, utilizando el programa estadístico Minitab versión 18.

4.

Resultados

4.1 Crecimiento de microalgas

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento en los sistemas de cultivo de microalgas se mantuvo por ciclos de 15 días para obtener una concentración de biomasa que permitiera aprovechar al máximo el medio de cultivo. Esto representó un reto puesto que en muchas ocasiones en el día 10 de crecimiento, los cultivos registraron concentraciones celulares altas con valores de absorbancia mayores que la unidad. Por lo anterior, para tomar mediciones de absorbancia apropiadas se realizaron diluciones con un factor 1:4. Este factor fue considerado también en las pruebas estadísticas.

Una concentración celular elevada impide la penetración de la luz, lo que a su vez provoca una disminución de la actividad fotosintética. El efecto de la concentración celular puede reducirse por medio de la aireación, operación que no solo provee del oxígeno para la fotosíntesis, sino que también promueve una homogenización del medio de cultivo. La agitación es una operación importante porque además disminuye la sedimentación de microalgas lo que puede llevar a una reducción en la intensidad de luz disponible para las células sedimentadas, afectando negativamente su crecimiento y la productividad global del cultivo. Finalmente, la agitación ayuda a que todas las células reciban una cantidad adecuada de luz, transportando las microalgas desde las zonas sombreadas a las zonas iluminadas, y viceversa.

La productividad de la biomasa se ve afectada por la duración, la longitud de onda y la intensidad de la luz expuesta a las microalgas. Si se aumenta la intensidad de la luz, aumentan también la tasa de crecimiento y la acumulación de lípidos hasta alcanzar un

valor máximo denominado saturación de luz de las microalgas, que es un equilibrio entre la fotorrespiración y la fotoinhibición [7].

Al inicio de los cultivos se presentó mucha variabilidad en el aumento del pH, las dos especies de microalgas en ambas condiciones de luz presentaban tendencia al aumento del pH, ocasionando un bajo crecimiento de células. Con el fin de mantener un pH estable (y no generar otro factor experimental) se aumentaron los niveles de fosfatos en el medio de cultivo, manteniendo así un pH estable. Asimismo, se ha reportado que el aumento de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo de microalgas pueden influir en el rendimiento de lípidos y ácidos grasos [7].

La **Figura 6** muestra el comportamiento del crecimiento de las microalgas en los diferentes biorreactores a una longitud de onda (λ) de 740 nm. Durante los primeros días de la operación del sistema (día 0 a día 3), las microalgas mostraron un crecimiento constante en ambas condiciones de luz. A partir del día 4, las microalgas comenzaron la fase de crecimiento exponencial. En el primer ciclo, los cultivos muestran un crecimiento hasta la fase exponencial; a partir del segundo ciclo, comenzaron a mostrar un aumento en las concentraciones de biomasa. Se observó una gran variabilidad al utilizar la luz solar en la microalga *N. oleoabundans* con picos muy elevados en los ciclos C2, C3, C4 y C5 que luego mostraron caídas abruptas en la biomasa. Por su parte, con iluminación LED los cultivos permanecieron muy constantes en su crecimiento. Para *C. vulgaris* se observó de igual manera una gran variabilidad en su crecimiento utilizando luz natural, mostrando solamente un pico elevado en el tercer ciclo. Igualmente, *C. vulgaris* crece de manera constante con iluminación LED. Sin embargo, *N. oleoabundans* mostró mayor producción de biomasa en comparación con *C. vulgaris*.

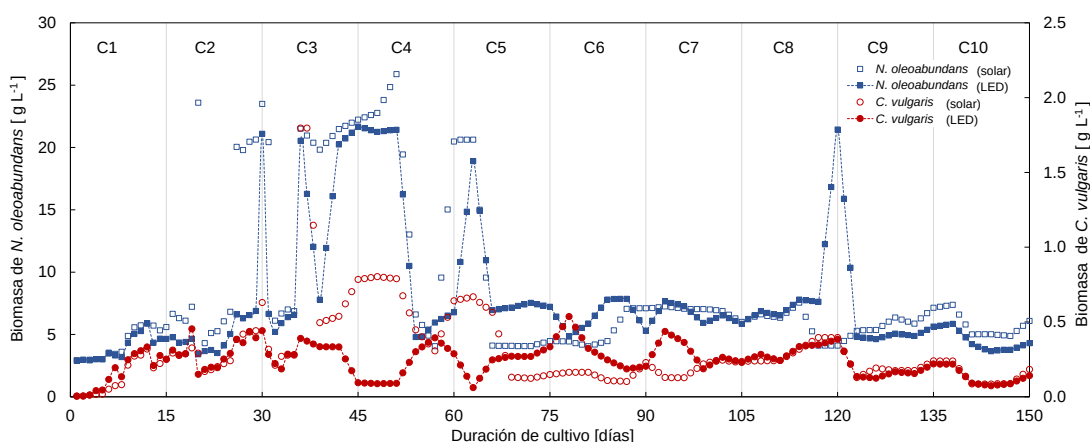


Figura 6. Comportamiento del crecimiento microalgal a dos condiciones de luz y a una $\lambda = 740$ nm.

Durante el todo el experimento, la concentración de biomasa de *N. oleoabundans* varió entre 2.9 y 25.9 g L⁻¹ empleando luz solar, con un promedio de 8.8 ± 6.4 g L⁻¹, en comparación con el rango de 2.9 a 21.7 g L⁻¹ empleando luz LED, y un promedio de 7.8 ± 5.0 g L⁻¹. De acuerdo con una prueba *t* no pareada para la comparación de medias, no existe diferencia significativa entre las concentraciones de biomasa de *N. oleoabundans* empleando los dos tipos de luz analizados en este estudio con una $\lambda = 740$ nm (valor *P*= 0.1326). Como resultado, se rechaza la hipótesis propuesta de que existe un efecto significativo en la producción de biomasa de *N. oleoabundans* al emplear luz LED en comparación al uso de luz natural. Sin embargo, lo anterior implica que, si bien no existe un incremento en la producción de biomasa empleando luz LED, los niveles de concentración no fueron menores por lo que puede emplearse este tipo de iluminación artificial para reemplazar al uso de luz natural, lo cual disminuiría el tiempo de producción.

Por su parte, durante la etapa experimental se obtuvieron concentraciones de biomasa de *C. vulgaris* en el rango entre 0.0 y 1.8 g L⁻¹ utilizando luz solar con un promedio de 0.3 ± 0.3 g L⁻¹. Además, cuando se empleó luz LED, la concentración de *C. vulgaris* varió entre 0.0 y 0.5 g L⁻¹ con un valor medio de 0.2 ± 0.1 g L⁻¹. En este caso, la prueba *t* indica que sí existe diferencia significativa entre las medias de las concentraciones de

C. vulgaris empleando los dos tipos de luz (valor $P = 0.0001$). Por lo anterior, en *C. vulgaris* se acepta la hipótesis de que existe un efecto significativo usando diferente fuente de luz, siendo en este caso, mayor la producción al emplear luz natural como fuente de iluminación.

Con respecto al crecimiento microalgal a la longitud de onda de 680 nm, la misma tendencia general se mostró para ambas cepas y los dos tipos de luz analizados (**Figura 7**). En el caso del crecimiento de *N. oleoabundans* al utilizar luz natural, el rango de concentración de biomasa varió entre 1.0 y 10.3 g L⁻¹ con un promedio de 3.5 ± 2.5 g L⁻¹. Sin embargo, cuando se empleó iluminación LED, el rango de concentración fluctuó entre 1.0 y 8.3 g L⁻¹ con una media de 3.1 ± 1.9 g L⁻¹. La prueba *t* no pareada indicó que no existe diferencia significativa con un valor $P = 0.1198$. Finalmente, el crecimiento de *C. vulgaris* empleando los dos tipos de luz a una $\lambda = 680$ nm fue de 0.3 ± 0.2 g L⁻¹ y 0.2 ± 0.1 g L⁻¹ para iluminación natural y LED, respectivamente, mostrando una diferencia claramente significativa entre los tratamientos.

Con respecto al efecto de la longitud de onda, debe notarse que las concentraciones promedio de biomasa para *N. oleoabundans* a una $\lambda = 740$ nm (8.8 ± 6.4 g L⁻¹ con luz natural y 7.8 ± 5.0 g L⁻¹ con luz LED) son claramente superiores a aquellas registradas a una $\lambda = 680$ nm (0.3 ± 0.3 g L⁻¹ con luz natural y 0.2 ± 0.1 g L⁻¹ con luz LED). De forma similar, las concentraciones promedio de biomasa de *C. vulgaris* a una $\lambda = 740$ nm (3.5 ± 2.5 g L⁻¹ con luz natural y 3.1 ± 1.9 g L⁻¹ con luz LED) son superiores a las registradas con $\lambda = 680$ nm (concentraciones no mayores a 0.3 g L⁻¹ para ambos tipos de luz). De acuerdo con estos resultados, se acepta la hipótesis de que la longitud de onda tiene un efecto significativo sobre la producción de biomasa de ambas especies de microalga, siendo la longitud de $\lambda = 740$ nm la que permitió mayores niveles de concentración, expresadas como densidad óptica.

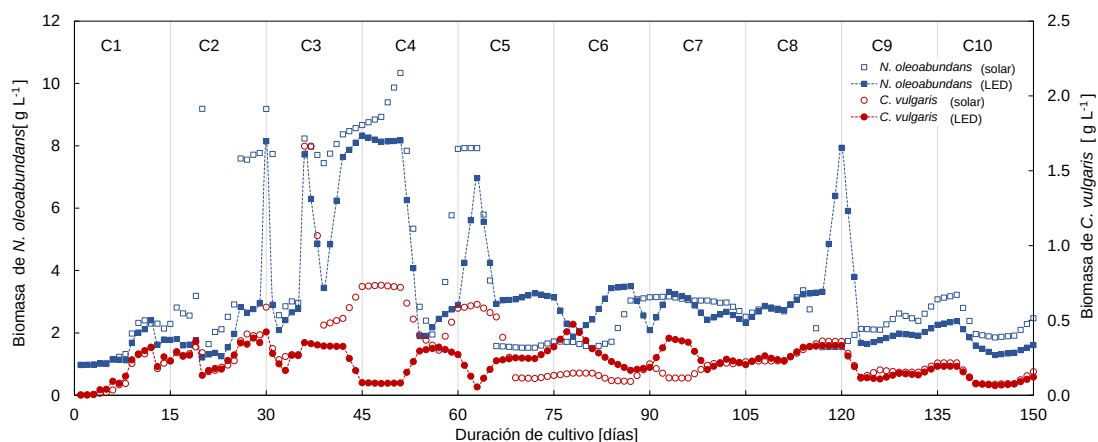


Figura 7. Comportamiento del crecimiento microalgal a dos condiciones de luz y a una $\lambda = 440$ nm.

Como se mencionó anteriormente, las fuentes de iluminación fueron medidas con un luxómetro. Los biorreactores cultivados con iluminación LED se cultivaron con una intensidad de 1000 - 1200 lux (valor promedio de 1101 ± 17 lux). Para los biorreactores cultivados con fuente de iluminación solar, las medidas fueron muy variables, desde el primer ciclo hasta el último ciclo, con un valor promedio de $57\,421 \pm 22\,952$ lux. Nótese que el coeficiente de variación para los registros de intensidad de la luz LED fue de tan solo el 1.6% mientras que para los registros de intensidad de la luz solar fue del 40%. Las medidas de intensidad de luz fueron tomadas desde el día 1 de cultivo, hasta el último día de cultivo, completando así 150 días.

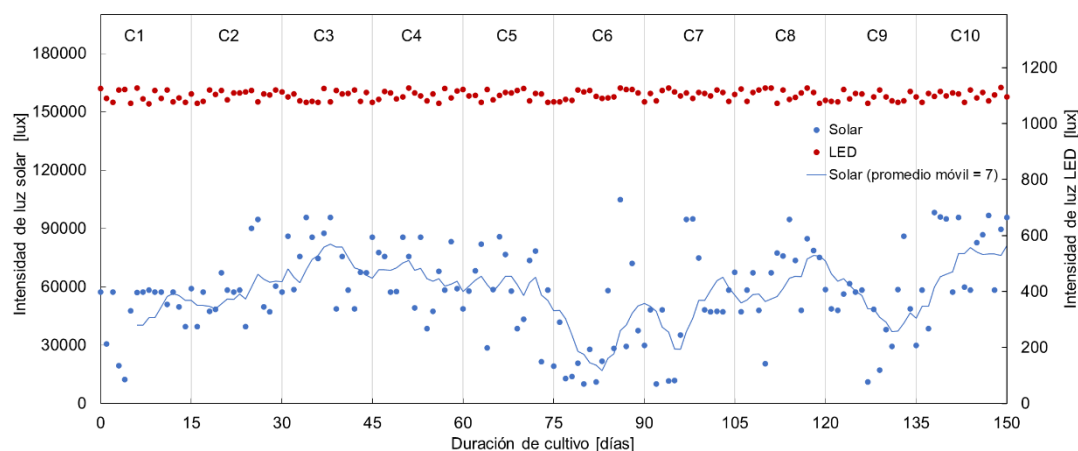


Figura 8. Variaciones de la intensidad de la luz durante el experimento.

4.2 Compuestos fenólicos

Las variaciones de la concentración de compuestos fenólicos en cada ciclo de cultivo se presentan en la **Figura 9**. Los resultados de la concentración de compuestos fenólicos se analizaron con la prueba de Fisher de un solo factor con una confianza del 95%. Las muestras de *N. oleoabundans* (solar) y *C. vulgaris* (LED) no presentaron diferencias importantes en las concentraciones de compuestos fenólicos en los nueve ciclos de crecimiento, en contraparte, los cultivos de microalgas *N. oleoabundans* (LED) y *C. vulgaris* (solar) presentaron diferencias en las concentraciones de compuestos fenólicos. De acuerdo con la figura, las concentraciones más altas en todos los biorreactores se obtuvieron durante el ciclo de cultivo C2, siendo la concentración promedio más alta en *N. oleoabundans* (LED), la cual no presentó diferencias importantes respecto a las demás concentraciones promedio. Las concentraciones más altas de compuestos fenólicos se presentaron cuando la concentración de lípidos era muy baja, esto es porque los compuestos fenólicos actúan como un mecanismo de defensa cuando las microalgas carecen de algún metabolito. En general, las concentraciones promedio de compuestos fenólicos en los cultivos de *N. oleoabundans* fueron de $0.039 \pm 0.032 \text{ mg g BS}^{-1} \text{ L}^{-1}$ y de $0.042 \pm 0.037 \text{ mg g BS}^{-1} \text{ L}^{-1}$ para luz solar

y luz LED, respectivamente. Una prueba *t* no pareada indica que no existe diferencia significativa entre estos valores promedio. De la misma forma, la concentración promedio en los cultivos de *N. oleoabundans* fueron de $0.032 \pm 0.020 \text{ mg g BS}^{-1} \text{ L}^{-1}$ y de $0.034 \pm 0.021 \text{ mg g BS}^{-1} \text{ L}^{-1}$ para luz solar y luz LED, sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos. Como sugieren los resultados, se rechaza la hipótesis de que la luz LED tiene un efecto significativo en la producción de compuestos fenólicos para las dos especies de microalga estudiadas.

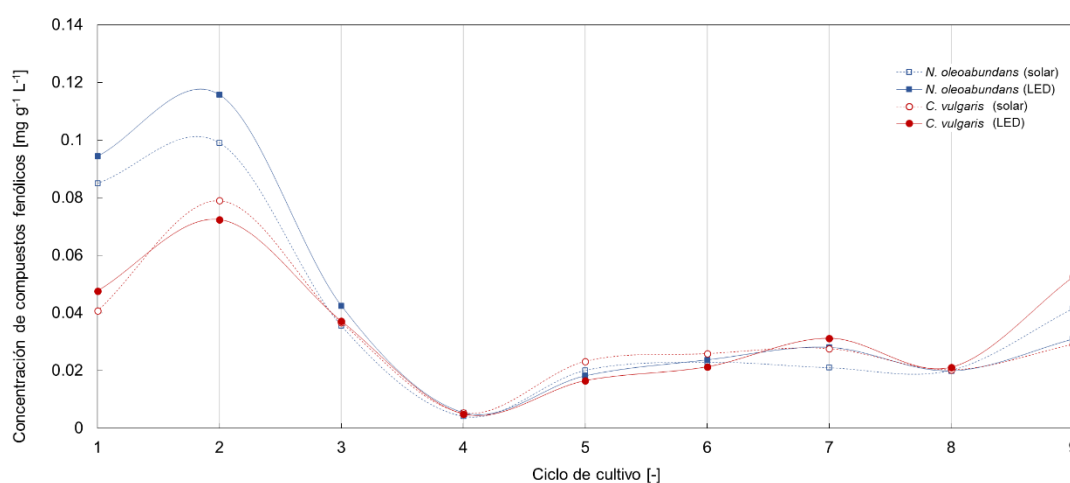


Figura 9. Variaciones de la concentración de compuestos fenólicos en función del ciclo de cultivo.

La concentración de los compuestos fenólicos en los cultivos pudo haber sido más marcado si se hubiesen sometido algún tipo de estrés, al ser metabolitos secundarios, se producen en mayor cantidad cuando disminuyen biomoléculas principales como lípidos, carbohidratos y proteínas, que no fueron estudiados.

5.

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En conclusión, aunque se rechaza la hipótesis de que la luz LED genera un efecto significativo en la producción de biomasa de *N. oleoabundans* en comparación con la luz natural, los resultados demostraron que este tipo de iluminación no disminuye los niveles de biomasa obtenida. Esto sugiere que la luz LED puede ser una alternativa viable a la luz natural, ofreciendo ventajas como el control de las condiciones de cultivo y la posibilidad de operar en entornos donde la luz solar es limitada o variable, como, por ejemplo, diferentes tipos de biorreactores, cultivos con concentraciones muy densas, o cultivos con iluminación ~~especifica~~ específica para un objetivo específica.

Por otro lado, se confirmó que el tipo de fuente de luz tiene un efecto significativo en la producción de biomasa de *C. vulgaris*, siendo la luz natural más efectiva, de acuerdo con la comparación que se hizo con la cepa de *C. vulgaris* cultivada con LED. Esto resalta la importancia de considerar la calidad y características de la luz en los sistemas de cultivo, especialmente cuando se busca maximizar la productividad de esta microalga. Como ya se ha mencionado, la fuente de iluminación es considerado el factor principal para el cultivo de las microalgas.

En el caso de las lecturas de densidad óptica podemos concluir que, los resultados confirman que la longitud de onda tiene un efecto significativo sobre la concentración de biomasa de microalga, en esta longitud de onda se pudo observar una mejor concentración de biomasa a una la longitud de onda en el rango de 740 nm, expresados

como densidad óptica. Esto destaca la relevancia de ajustar el espectro lumínico en los sistemas de cultivo para optimizar la productividad.

Por último, los resultados indican que la luz LED no tiene un efecto significativo en la producción de compuestos fenólicos en las dos especies de microalgas estudiadas. Esto sugiere que este tipo de iluminación no influye en la síntesis de estos compuestos, lo que podría orientar a futuras investigaciones hacia otros factores que impacten su producción.

5.2 Recomendaciones

Se expresan algunas recomendaciones para mejorar el cultivo de las microalgas.

1. Utilizar el espectro adecuado para maximizar la fotosíntesis. Para identificar cual es la mejor opción para un mejor aprovechamiento del cultivo. Esto va de acuerdo con el objetivo del cultivo de las microalgas.
2. La intensidad de luz se debe adecuar, al igual que el espectro al objetivo del cultivo y para evitar la saturación fotosintética o el estrés lumínico.
3. Las lámparas LED son adecuadas para el cultivo de microalgas, se puede tener un mayor control en la iluminación del cultivo, estableciendo fotoperiodos que sean más adecuados para el objetivo de cada cultivo, optimizando el metabolismo, sin embargo, para este caso es importante mencionar que la aireación de los cultivos jugaría un papel importante, para que todo el cultivo tenga contacto con la iluminación.

4. Se recomienda mantener controlado algunos parámetros como el pH y la temperatura, esto permite concentrar la atención en otras cuestiones del cultivo.
5. Para la obtención de compuestos fenólicos es importante identificar si la microalga con la que se quiere trabajar es capaz de sintetizar compuestos fenólicos y en que porcentaje, antes de realizar la implementación del cultivo.
6. Es importante saber que los compuestos fenólicos aumentan como mecanismo de defensas del cultivo; por lo que se recomienda que si se busca una producción de estos metabolitos bajar la producción de lípidos.

Referencias

- [1] G. Y. Yew *et al.*, “Recent advances in algae biodiesel production: From upstream cultivation to downstream processing,” *Bioresour. Technol. Reports*, vol. 7, p. 100227, 2019, doi: [10.1016/j.biteb.2019.100227](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100227).
- [2] M. Dębowski, M. Zieliński, J. Kazimierowicz, N. Kujawska, and S. Talbierz, “Microalgae cultivation technologies as an opportunity for bioenergetic system development—advantages and limitations,” *Sustain.*, vol. 12, no. 23, pp. 1–37, 2020, doi: [10.3390/su12239980](https://doi.org/10.3390/su12239980).
- [3] Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, and N. Dubois-Calero, “Biofuels from microalgae,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 4, pp. 815–820, 2008, doi: [10.1021/bp.070371k](https://doi.org/10.1021/bp.070371k).
- [4] E. Erickson, S. Wakao, and K. K. Niyogi, “Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant J.*, vol. 82, no. 3, pp. 449–465, 2015, doi: [10.1111/tpj.12825](https://doi.org/10.1111/tpj.12825).
- [5] R. N. Singh and S. Sharma, “Development of suitable photobioreactor for algae production – A review,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, pp. 2347–2353, 2012, doi: [10.1016/j.rser.2012.01.026](https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026).
- [6] M. Płaczek, A. Patyna, and S. Witczak, “Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation,” *E3S Web Conf.*, vol. 19, pp. 1–10, 2017, doi: [10.1051/e3sconf/20171902032](https://doi.org/10.1051/e3sconf/20171902032).
- [7] M. Rehman, S. Kesharvani, G. Dwivedi, and K. G. Suneja, “Materials Today : Proceedings Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content,” *Mater. Today Proc.*, vol. 56, pp. 282–290, 2022, doi: [10.1016/j.matpr.2022.01.152](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.152).
- [8] M. N. Metsoviti, G. Papapolymerou, I. T. Karapanagiotidis, and N. Katsoulas, “Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*,” pp. 1–17, 2019, doi: [10.3390/plants9010031](https://doi.org/10.3390/plants9010031).
- [9] M. Latasa, “Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances”, *Sci Mar*, vol. 59, pp. 25–37, 1995.
- [10] Z. Amini Khoeyi, J. Seyfabadi, y Z. Ramezanpour, “Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella*

- vulgaris”, *Aquacult Int*, vol. 20, núm. 1, pp. 41–49, feb. 2012, doi: [10.1007/s10499-011-9440-1](https://doi.org/10.1007/s10499-011-9440-1).
- [11] S. Wahidin, A. Idris, y S. R. M. Shaleh, “The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp.”, *Bioresource Technology*, vol. 129, pp. 7–11, feb. 2013, doi: [10.1016/j.biortech.2012.11.032](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032).
- [12] J. S. Brown y C. S. French, “Absorption Spectra and Relative Photostability of the Different Forms of Chlorophyll in *Chlorella*.”, *Plant Physiol.*, vol. 34, núm. 3, pp. 305–309, may 1959, doi: [10.1104/pp.34.3.305](https://doi.org/10.1104/pp.34.3.305).
- [13] I. Harun, L. Yahya, M. N. Chik, N. N. A. Kadir, y M. A. M. A. Pang, “Effects of Natural Light Dilution on Microalgae Growth”, *IJCEA*, vol. 5, núm. 2, pp. 112–116, abr. 2014, doi: [10.7763/IJCEA.2014.V5.362](https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.362).
- [14] S. Devaraja, M. Bharath, K. Deepak, B. Suganya, B. S. Vishal, D. Swaminathan and N. Meyyappan, “Studies on the Effect of Red, Blue and White LED Lights on the Productivity of *Chlorella Vulgaris* to Treat Dye Industry Effluent”, *AIBM*, vol. 6, núm. 2, ago. 2017, doi: [10.19080/AIBM.2017.06.555682](https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.06.555682).
- [15] K. Michel y A. Eisentraeger, “Light-emitting diodes for the illumination of algae in ecotoxicity testing”, *Environmental Toxicology*, vol. 19, núm. 6, pp. 609–613, dic. 2004, doi: [10.1002/tox.20069](https://doi.org/10.1002/tox.20069).
- [16] R. J. Ritchie y S. Sma-Air, “Microalgae grown under different light sources”, *J Appl Phycol*, vol. 35, núm. 2, pp. 551–566, abr. 2023, doi: [10.1007/s10811-023-02917-0](https://doi.org/10.1007/s10811-023-02917-0).
- [17] A. Baidya *et al.*, “Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll, β -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*”, *Heliyon*, vol. 7, núm. 12, p. e08525, dic. 2021, doi: [10.1016/j.heliyon.2021.e08525](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08525).
- [18] A. Khalili, G. D. Najafpour, G. Amini, y F. Samkhaniyani, “Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*”, *Biotechnol Bioproc E*, vol. 20, núm. 2, pp. 284–290, abr. 2015, doi: [10.1007/s12257-013-0845-8](https://doi.org/10.1007/s12257-013-0845-8).
- [19] Y. Eilam, H. Khattib, N. Pintel, y D. Avni, “Microalgae—Sustainable Source for Alternative Proteins and Functional Ingredients Promoting Gut and Liver Health”, *Global Challenges*, vol. 7, núm. 5, p. 2200177, may 2023, doi: [10.1002/gch2.202200177](https://doi.org/10.1002/gch2.202200177).
- [20] N. G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2 Tereshchenkovskaya Str.,

- Kiev 01004, Ukraine, E. K. Zolotareva, V. M. Mokrosnop, S. S. Stepanov, y N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2 Tereshchenkovskaya Str., Kiev 01004, Ukraine, “Polyphenol compounds of macroscopic and microscopic algae”, *Algologia*, vol. 29, núm. 1, pp. 3–29, mar. 2019, doi: [10.15407/alg29.01.003](https://doi.org/10.15407/alg29.01.003).
- [21] V. Cheynier, G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio, y S. Martens, “Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology”, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 72, pp. 1–20, nov. 2013, doi: [10.1016/j.plaphy.2013.05.009](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009).
- [22] A. Del Mondo *et al.*, “Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals”, *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 41, núm. 2, pp. 155–171, feb. 2021, doi: [10.1080/07388551.2021.1874284](https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874284).
- [23] C. Faraloni, T. Di Lorenzo, y A. Bonetti, “Impact of Light Stress on the Synthesis of Both Antioxidants Polyphenols and Carotenoids, as Fast Photoprotective Response in *Chlamydomonas reinhardtii*: New Prospective for Biotechnological Potential of This Microalga”, *Symmetry*, vol. 13, núm. 11, p. 2220, nov. 2021, doi: [10.3390/sym13112220](https://doi.org/10.3390/sym13112220).
- [24] L. M. Andrade, “Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview”, *MOJFPT*, vol. 6, núm. 1, ene. 2018, doi: [10.15406/mojfpt.2018.06.00144](https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00144).
- [25] T. O. Bellahcen *et al.*, “Evaluation of Moroccan microalgae: *Spirulina platensis* as a potential source of natural antioxidants”, *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, vol. 17, núm. 3, p. 20190036, oct. 2020, doi: [10.1515/jcim-2019-0036](https://doi.org/10.1515/jcim-2019-0036).
- [26] L. Ramanna, I. Rawat, y F. Bux, “Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 80, pp. 765–773, dic. 2017, doi: [10.1016/j.rser.2017.05.202](https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.202).
- [27] M. I. Khan, J. H. Shin, y J. D. Kim, “The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products”, *Microb Cell Fact*, vol. 17, núm. 1, p. 36, dic. 2018, doi: [10.1186/s12934-018-0879-x](https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x).
- [28] R. Raja, S. Hemaiswarya, N. A. Kumar, S. Sridhar, y R. Rengasamy, “A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae”, *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 34, núm. 2, pp. 77–88, ene. 2008, doi: [10.1080/10408410802086783](https://doi.org/10.1080/10408410802086783).

- [29] G. Zuccaro, A. Yousuf, A. Pollio, y J.-P. Steyer, “Microalgae Cultivation Systems”, en *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, Elsevier, 2020, pp. 11–29. doi: [10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3).
- [30] S. R. Chia *et al.*, “Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production,” *Renew. Energy*, vol. 129, pp. 838–852, 2018, doi: [10.1016/j.renene.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.001).
- [31] J. Barber, “Photosynthetic energy conversion: natural and artificial”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, núm. 1, pp. 185–196, 2009, doi: [10.1039/B802262N](https://doi.org/10.1039/B802262N).
- [32] A. Lehmuskero, M. Skogen Chauton, y T. Boström, “Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes”, *Progress in Oceanography*, vol. 168, pp. 43–56, nov. 2018, doi: [10.1016/j.pocean.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002).
- [33] Y. Zarri *et al.*, “Enhanced Algal Photosynthetic Photon Efficiency by Pulsed Light,” *iScience*, vol. 23, no. 5, p. 101115, 2020, doi: [10.1016/j.isci.2020.101115](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101115).
- [34] J. Mehar, A. Shekh, M. U. Nethravathy, R. Sarada, V. S. Chauhan, and S. Mudliar, “Automation of pilot-scale open raceway pond: A case study of CO₂-fed pH control on Spirulina biomass, protein and phycocyanin production,” *J. CO₂ Util.*, vol. 33, no. July, pp. 384–393, 2019, doi: [10.1016/j.jcou.2019.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.006).
- [35] F. Abiusi, R. H. Wijffels, and M. Janssen, “Doubling of Microalgae Productivity by Oxygen Balanced Mixotrophy,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 15, pp. 6065–6074, 2020, doi: [10.1021/acssuschemeng.0c00990](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00990).
- [36] Y. Maltsev, K. Maltseva, M. Kulikovskiy, and S. Maltseva, “Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition,” *Biology (Basel)*, vol. 10, no. 10, pp. 1–24, 2021, doi: doi.org/10.3390/biology10101060.
- [37] R. S. C. Wong, Y.K.; Ho, Y.H.; Lai, Y.T.; Tsang, P.M.; Chow, K.P.; Yau, Y.H.; Choi, M.C.; Ho, “Effects of light intensity, illumination cycles on microalgae Haematococcus pluvialis for production of astaxanthin,” *Aquacult*, vol. 2, pp. 1–6, 2016.
- [38] S. K. Singh, R. Kaur, A. Bansal, S. Kapur, and S. Sundaram, *Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds*. Elsevier B.V., 2019. doi: [10.1016/B978-0-444-64323-0.00008-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00008-4).
- [39] P. S. C. Schulze, L. A. Barreira, H. G. C. Pereira, J. A. Perales, and J. C. S. Varela, “Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production,”

- Trends Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 422–430, 2014, doi: [10.1016/j.tibtech.2014.06.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001).
- [40] H. C. P. Matthijs, H. Balke, U. M. Van Hes, B. M. A. Kroon, L. R. Mur, and R. A. Binot, “Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*),” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 50, no. 1, pp. 98–107, 1996, doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960405\)50:1<98::AID-BIT11>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<98::AID-BIT11>3.0.CO;2-3).
 - [41] Y. Zhao, J. Wang, H. Zhang, C. Yan, and Y. Zhang, “Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process,” *Bioresour. Technol.*, vol. 136, pp. 461–468, 2013, doi: [10.1016/j.biortech.2013.03.051](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.051).
 - [42] Y. Gao, O. Bernard, A. Fanesi, P. Perré, and F. Lopes, “The effect of light intensity on microalgae biofilm structures and physiology under continuous illumination,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–11, 2024, doi: [10.1038/s41598-023-50432-6](https://doi.org/10.1038/s41598-023-50432-6).
 - [43] Y. S. Khaw *et al.*, “Fucoxanthin Production of Microalgae under Different Culture Factors: A Systematic Review,” *Mar. Drugs*, vol. 20, no. 10, pp. 1–25, 2022, doi: [10.3390/md20100592](https://doi.org/10.3390/md20100592).
 - [44] F. Gao, I. Teles (Cabanelas, ITD), N. Ferrer-Ledo, R. H. Wijffels, and M. J. Barbosa, “Production and high throughput quantification of fucoxanthin and lipids in *Tisochrysis lutea* using single-cell fluorescence,” *Bioresour. Technol.*, vol. 318, no. September, p. 124104, 2020, doi: [10.1016/j.biortech.2020.124104](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124104).
 - [45] A. H. Banskota, S. Sperker, R. Stefanova, P. J. McGinn, and S. J. B. O’Leary, “Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 31, no. 1, pp. 309–318, 2019, doi: [10.1007/s10811-018-1523-1](https://doi.org/10.1007/s10811-018-1523-1).
 - [46] I. Khozin-Goldberg and Z. Cohen, “The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*,” *Phytochemistry*, vol. 67, no. 7, pp. 696–701, 2006, doi: [10.1016/j.phytochem.2006.01.010](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010).
 - [47] M. Prathima Devi and S. Venkata Mohan, “CO₂ supplementation to domestic wastewater enhances microalgae lipid accumulation under mixotrophic microenvironment: Effect of sparging period and interval,” *Bioresour. Technol.*, vol. 112, pp. 116–123, 2012, doi: [10.1016/j.biortech.2012.02.095](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.095).
 - [48] S. P. Singh y P. Singh, “Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 50, pp. 431–444, oct. 2015, doi: [10.1016/j.rser.2015.05.024](https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024).

- [49] L. J. Rothschild y R. L. Mancinelli, “Life in extreme environments”, *Nature*, vol. 409, núm. 6823, pp. 1092–1101, feb. 2001, doi: [10.1038/35059215](https://doi.org/10.1038/35059215).
- [50] Q. Béchet, M. Laviale, N. Arsapin, H. Bonnefond, and O. Bernard, “Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: [10.1186/s13068-017-0823-z](https://doi.org/10.1186/s13068-017-0823-z).
- [51] M. E. Salvucci and S. J. Crafts-Brandner, “Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments,” *Plant Physiol.*, vol. 134, no. 4, pp. 1460–1470, 2004, doi: [10.1104/pp.103.038323](https://doi.org/10.1104/pp.103.038323).
- [52] V. Beuzenberg, E. O. Goodwin, J. Puddick, D. Romanazzi, S. L. Adams, and M. A. Packer, “Optimising conditions for growth and xanthophyll production in continuous culture of *Tisochrysis lutea* using photobioreactor arrays and central composite design experiments,” *New Zeal. J. Bot.*, vol. 55, no. 1, pp. 64–78, 2017, doi: [10.1080/0028825X.2016.1238398](https://doi.org/10.1080/0028825X.2016.1238398).
- [53] A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, y M. Del Borghi, “Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production”, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 48, núm. 6, pp. 1146–1151, jun. 2009, doi: [10.1016/j.cep.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006).
- [54] V. Vecchi, S. Barera, R. Bassi, and L. Dall’osto, “Potential and challenges of improving photosynthesis in algae,” *Plants*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: [10.3390/plants9010067](https://doi.org/10.3390/plants9010067).
- [55] A. Shekh, A. Sharma, P. M. Schenk, G. Kumar, and S. Mudliar, “Microalgae cultivation: photobioreactors, CO₂ utilization, and value-added products of industrial importance,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 5, pp. 1064–1085, 2022, doi: [10.1002/jctb.6902](https://doi.org/10.1002/jctb.6902).
- [56] D. D. McClure, A. Luiz, B. Gerber, G. W. Barton, and J. M. Kavanagh, “An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*,” *Algal Res.*, vol. 29, no. August 2017, pp. 41–48, 2018, doi: [10.1016/j.algal.2017.11.015](https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.015).
- [57] M. V. L. Chhandama, K. B. Satyan, B. Changmai, C. Vanlalveni, y S. L. Rokhum, “Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review”, *Bioresource Technology Reports*, vol. 15, p. 100771, sep. 2021, doi: [10.1016/j.biteb.2021.100771](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100771).

- [58] J. Jin, C. Dupré, J. Legrand, and D. Grizeau, “Extracellular hydrocarbon and intracellular lipid accumulation are related to nutrient-sufficient conditions in pH-controlled chemostat cultures of the microalga *Botryococcus braunii* SAG 30.81,” *Algal Res.*, vol. 17, pp. 244–252, 2016, doi: [10.1016/j.algal.2016.05.007](https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.007).
- [59] K. Brindhadevi, T. Mathimani, E. R. Rene, S. Shanmugam, N. T. L. Chi, and A. Pugazhendhi, “Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel,” *Fuel*, vol. 284, no. April 2020, p. 119058, 2021, doi: [10.1016/j.fuel.2020.119058](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119058).
- [60] R. Qiu, S. Gao, P. A. Lopez, and K. L. Ogden, “Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*,” *Algal Res.*, vol. 28, no. May, pp. 192–199, 2017, doi: [10.1016/j.algal.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004).
- [61] A. Maadane *et al.*, “Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content,” *J. Biotechnol.*, vol. 215, pp. 13–19, 2015, doi: [10.1016/j.jbiotec.2015.06.400](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400).
- [62] Sk. Y. A. Siddiki *et al.*, “Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept”, *Fuel*, vol. 307, p. 121782, ene. 2022, doi: [10.1016/j.fuel.2021.121782](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121782).
- [63] S. Dickinson *et al.*, “A review of biodiesel production from microalgae,” *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 19, no. 3, pp. 637–668, 2017, doi: [10.1007/s10098-016-1309-6](https://doi.org/10.1007/s10098-016-1309-6).
- [64] O. Martínez-Cruz y O. Paredes-López, “Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1346, pp. 43–48, jun. 2014, doi: [10.1016/j.chroma.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.007).
- [65] Zárate-López, Mónica A., “Detección de respuestas a estrés del alga *Neochloris oleoabundans* al aplicar su propio ADN”, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, 2023.
- [66] C. G. Khoo, M. K. Lam, A. R. Mohamed, y K. T. Lee, “Hydrochar production from high-ash low-lipid microalgal biomass via hydrothermal carbonization: Effects of operational parameters and products characterization”, *Environmental Research*, vol. 188, p. 109828, sep. 2020, doi: [10.1016/j.envres.2020.109828](https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109828).
- [69] Abd El-Baky, H. H. El Baz, F.K. y G.S El Baroty, “Production of phenolic

compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, pp. 7059–7067, dic. 2009.

- [70] M. Monteiro et al., “Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro- and microalgae extracts”, *J Appl Phycol*, vol. 32, pp. 349–362, feb. 2020, doi: [10.1007/s10811-019-01927-1](https://doi.org/10.1007/s10811-019-01927-1).