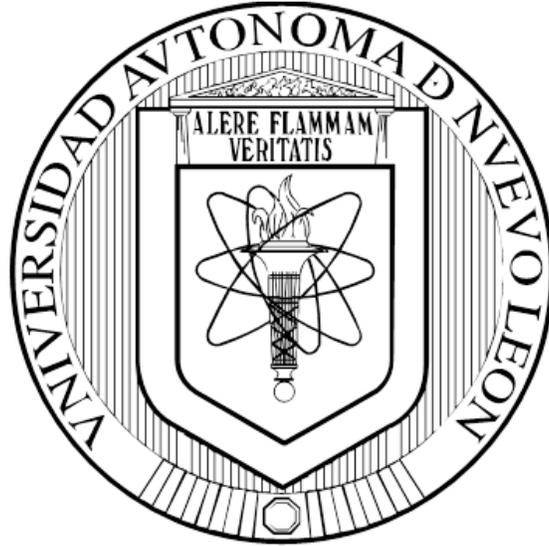


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CARBOHIDRATOS EN EXOPOLISACÁRIDO
DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS* Y *CHLORELLA* SP. MICROALGAS ÚTILES
PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

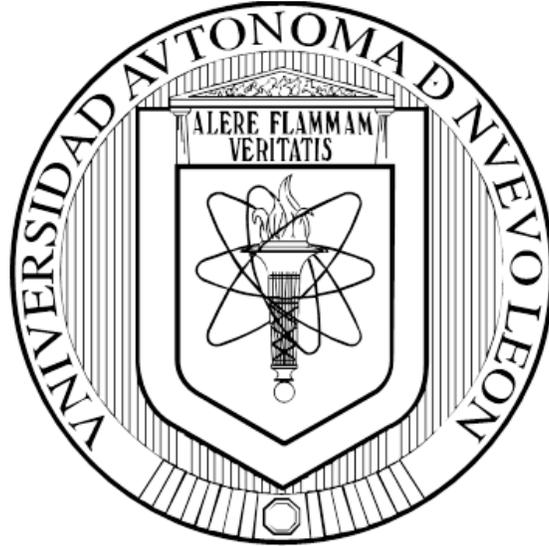
POR

JULIÁN ALBERTO JESÚS ZARAGOZA CARMONA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

JULIO, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CARBOHIDRATOS EN EXOPOLISACÁRIDO
DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS* Y *CHLORELLA* SP. MICROALGAS UTILES
PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

POR

JULIÁN ALBERTO JESÚS ZARAGOZA CARMONA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

JULIO, 2016

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CARBOHIDRATOS EN EXOPOLISACÁRIDO
DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS* Y *CHLORELLA* SP. MICROALGAS UTILES
PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Comité de Tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Presidente

Dra. María del Socorro Flores González
Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal

Dra. Laura María Trejo Ávila
Vocal

Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Vocal

Dra. Eugenia J. Olgún Palacios
Asesor Externo

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CARBOHIDRATOS EN EXOPOLISACÁRIDO
DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS* Y *CHLORELLA* SP. MICROALGAS UTILES
PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Dirección de Tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Director

Dra. María del Socorro Flores González
Codirector

Dra. Eugenia J. Olgún Palacios
Director externo

INDICE

1.	INTRODUCCION	1
1.1	Aplicación general de biomasa de microalgas	1
1.2	Biodiesel a partir de microalgas	2
2.	ANTECEDENTES	4
2.1	Cosecha de microalgas: Etapa sustancial para el proceso de producción de biodiesel	4
2.2	Inducción de floculación para la cosecha de microalgas	7
2.3	Floculación Química	7
2.4	Floculación química (adición de inorgánicos, quitosán y polielectrolitos)	8
2.5	Biofloculación en microalgas	9
2.6	Exopolisacáridos y su rol en floculación	10
2.7	Biofloculación mediante el uso de compuestos biofloculantes (EPS)	11
2.8	Autofloculación	12
2.9	<i>Neochloris oleoabundans</i>	15
2.10	<i>Chlorella</i> sp.	17
3.	JUSTIFICACION	19
4.	HIPOTESIS	20
5.	OBJETIVOS	21
6.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
7.	MATERIAL Y METODOS	23
7.1	Medios de cultivo	23
7.2	Tinción de capsula	24
7.3	Extracción de EPS	24
7.4	Hidrólisis de pared celular	25
7.5	Cuantificación de Azúcares	26
7.6	Azúcares Totales	26
7.7	Azúcares Neutros	27
7.8	Ácidos Urónicos	27

7.9	Cuantificación de proteína	27
7.10	Análisis de FTIR	28
7.11	Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).....	28
7.12	Condiciones de análisis	29
7.13	Microalgas y medios de cultivo de consorcios (biomasa fresca).....	30
7.14	Determinación de crecimiento de biomasa por peso seco, pH, conductividad y consumo de nutrientes.....	33
7.15	Eficiencia de floculación.....	34
7.16	Procedimiento para la extracción de EPS	35
7.17	Caracterización de los EPS de los consorcios de microalgas	35
7.18	Análisis de EPS por FTIR y cromatografía de gases GC/MS.....	35
8.	RESULTADOS Y DISCUSION	36
8.1	Tinción de capsula.....	36
8.2	Extracción de EPS.....	37
8.3	Azucares Totales	38
8.4	Azucares Neutros	39
8.5	Ácidos Urónicos.....	40
8.6	Cuantificación de proteína	41
8.7	Análisis de FTIR	41
8.8	Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).....	43
8.9	Determinación de crecimiento de biomasa por peso seco, pH, conductividad y consumo de nutrientes.....	46
8.10	pH y conductividad	51
8.11	Eficiencia de floculación.....	52
8.12	Rendimiento y caracterización de EPS	56
8.13	Análisis de EPS por FTIR y cromatografía de gases GC/MS.....	56
9.	CONCLUSIONES	58
10.	PERSPECTIVAS	59
11.	BIBLIOGRAFIA.....	61

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 BIOMASA DE MICROALGAS DEL INECOL.....	23
TABLA 2 BIOMASA UTILIZADA PARA HIDROLISIS	25
TABLA 3 CONCENTRACIONES DE ESTÁNDARES UTILIZADOS PARA ANÁLISIS CG-MS.....	27
TABLA 4 CONDICIONES DE CORRIDA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A MASAS	29
TABLA 5 COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.	30
TABLA 6 AJUSTE DE INOCULO DE LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS UTILIZADOS.	30
TABLA 7 RENDIMIENTO DE COMPUESTO EXTRACELULAR DE MICROALGAS.....	37
TABLA 8 CONTENIDO DE PROTEÍNA DE EPS DE MICROALGAS PROPORCIONADAS POR INECOL.....	39
TABLA 9 RENDIMIENTO DE EPS DE LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS EN DISTINTOS MEDIOS	54

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 PRODUCTIVIDAD DE ACEITE DE LAS MICROALGAS EN COMPARACIÓN CON LOS CULTIVOS CONVENCIONALES	4
FIGURA 2 <i>NEOCHLORIS OLEOABUNDANS</i> IMAGEN	17
FIGURA 3 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE EPS POR MÉTODO CHAIKLAHAN	25
FIGURA 4 CONSTRUCCIÓN DE LOS BIORREACTORES PARA CULTIVO DE CONSORCIOS	31
FIGURA 5 TOMA DE ALÍCUOTAS PARA DETERMINACIÓN DE PESO SECO	32
FIGURA 6 DIAGRAMA DE ENSAYO PARA EFICIENCIA DE FLOCULACIÓN	33
FIGURA 7 PRESENCIA DE CAPSULA (EPS) EN CÉLULAS DE <i>NEOCHLORIS OLEOABUNDANS</i> Y <i>CHLORELLA</i> SP. TINCIÓN DE ROJO CONGO.....	35
FIGURA 8 AZÚCARES TOTALES DE LAS DIFERENTES MUESTRAS ANALIZADAS	37
FIGURA 9 AZÚCARES NEUTROS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS ANALIZADAS.....	38
FIGURA 10 ÁCIDOS URÓNICOS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS ANALIZADAS	39
FIGURA 11 ESPECTROS DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER. DE <i>NEOCHLORIS OLEOABUNDANS</i>	40
FIGURA 12 ESPECTRO DE INFRARROJO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER DE <i>CHLORELLA</i> SP.....	41
FIGURA 13 CROMATOGRAMA DE AZÚCARES NEUTROS ANALIZADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A MASAS.	42
FIGURA 14 CROMATOGRAMA DE EPS EXTRAÍDOS DE BIOMASAS PROPORCIONADAS POR INECOL.....	43
FIGURA 15 PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA DE LOS CONSORCIOS EN LOS DISTINTOS MEDIOS	45
FIGURA 16 ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO INORGÁNICO	46
FIGURA 17 CONSUMO DE N POR LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS	47

FIGURA 18 CONSUMO DE P POR LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS	48
FIGURA 19 VALORES DE pH A LO LARGO DEL CULTIVO DE LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS.	49
FIGURA 20 CONDUCTIVIDAD DE LOS DISTINTOS MEDIOS A LO LARGO DEL CULTIVO DE CONSORCIOS	50
FIGURA 21 EFICIENCIA DE FLOCULACIÓN CONFORME PASO DEL TIEMPO DE LOS CULTIVOS EN DISTINTOS MEDIOS	51
FIGURA 22 EFICIENCIA DE FLOCULACIÓN DE LOS CONSORCIOS A LOS 21 DÍAS DE CULTIVO	53
FIGURA 23 EFICIENCIA DE FLOCULACIÓN DEL CONSORCIO 01A A LOS 21 DÍAS DE CULTIVO	53
FIGURA 24 ESPECTRO DE IR DEL CONSORCIO 01A	55

RESUMEN

Neochloris oleoabundans es una microalga verde con un gran potencial para la producción de biodiesel, *Chlorella* sp. es una de las microalgas más estudiadas, y es otro género con potencial para producción de biodiesel y conocida por su capacidad de producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Uno de los mayores retos en la producción de biodiesel consiste en el proceso de cosecha, implicando altos costos; la presencia de EPS se ha relacionado con procesos de floculación en algunas microalgas. La presencia de EPS fue analizada en medio basal bold (BBM) y EAV (efluente anaerobio de vinazas) al 6 (v/v) de vinaza diluida en agua destilada para *N. oleoabundans* y un cultivo en dos etapas BBM 3N/-N para *Chlorella* sp. El mayor rendimiento de EPS (0.120 g/g) fue producido en medio EAV de la biomasa de *N. oleoabundans*; este EPS presentó la menor cantidad de azúcares totales (24.40 mg/g) y el mayor contenido de proteína (3.24 mg/g) mientras en *Chlorella* sp. el EPS obtenido en BBM 3N/-N presentó 46.78 mg/g de carbohidratos totales y 0.77 mg/g de proteína. La cantidad de azúcares neutrales en los EPS estuvo en un rango de 25 a 30 mg/g. El análisis CG/MS de los monosacáridos derivados a acetatos de alditol del exopolisacárido indicó que existían solo dos picos correspondientes a glucosa y galactosa.

ABSTRACT

Neochloris oleoabundans is a green microalga that has great potential for the production of biodiesel, *Chlorella* sp. one of the most studied microalgae, and is another genus with potential of biodiesel production, and known to produce extracellular polymeric substances (EPS). One of the major bottlenecks in the production of biodiesel is the harvesting process, which implies high costs; the presence of EPS has been related with flocculation process in some microalgae. The presence of EPS was analyzed in basal bold medium (BBM) and AEV (anaerobic effluent vinasse medium) 6% (v/v) of vinasse diluted with distilled water for *N. oleoabundans* and a two stage culture BBM 3N/-N for *Chlorella* sp. The highest yield of EPS (0.120 g/g) was produced in the AEV medium from *N. oleoabundans* biomass; this EPS presented the lowest total sugar (24.40 mg/g) and highest total protein content (3.24 mg/g) whereas for *Chlorella* sp. the EPS obtained in the BBM 3N/-N presented 46.78 mg/g of total carbohydrate and 0.77 mg/g of protein. The amount of neutral sugars in the EPS obtained ranged from 25 to 30 mg/g. The GC-MS analysis of the monosaccharide alditol of the exopolysaccharides indicated that there were only two peaks corresponding to glucose and galactose.

1. INTRODUCCION

1.1 Aplicación general de biomasa de microalgas

El primer uso de microalgas por el hombre se registró hace 2000 años por los chinos, quienes utilizaron *Nostoc* para sobrevivir durante la hambruna. Sin embargo, la biotecnología de microalgas sólo comenzó realmente a desarrollarse a mediados del siglo pasado. Hoy en día, existen numerosas aplicaciones comerciales de las microalgas. Actualmente, existen numerosas aplicaciones comerciales de microalgas, por ejemplo: directamente la biomasa obtenida de su cultivo, como aditivos para incrementar el valor nutricional de alimentos para humano y animales (específicamente en el área de acuicultura); incorporadas en cosméticos; o el aprovechamiento de moléculas de alto valor producidas por estos organismos como ácidos grasos poli-insaturados los cuales son agregados en fórmulas para alimentación infantil y en suplementos nutricionales; así como pigmentos naturales con aplicación en industria alimentaria y cosmética. Autores consideran que la investigación en microalgas podría enfocarse a la mejora en los sistemas de producción y la modificación genética de cepas, ya que los productos a partir de microalgas podrían diversificarse y hacerse más competitivos económicamente (Spolaore et al. 2006).

Por otro lado, el uso de las microalgas en la producción de bioenergéticos es uno de los temas de mayor actualidad en donde se han enfocado muchas industrias a nivel mundial. Además, se espera que esta demanda se incremente >50% en las próximas décadas (Foley et al. 2011; González-Fernández and Ballesteros 2012).

Es evidente que para cualquiera de las aplicaciones mencionadas es necesario contar con altos rendimientos de biomasa, por lo que la optimización del proceso es un área de oportunidad en el campo de la biotecnología.

Particularmente en el tema de la seguridad energética, el incremento del precio del petróleo, el agotamiento de recursos y el cambio climático, estos son algunos de los grandes retos que presentará nuestra sociedad en las décadas siguientes. Por lo que el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles y la construcción de biorefinerías puede ser considerada que podría mitigar estos problemas y crear economías sustentables y mejor balanceadas (Daroch et al. 2013).

1.2 Biodiesel a partir de microalgas

Debido a la influencia ambiental negativa y a su disponibilidad cada vez más limitada, los combustibles derivados de petróleo necesitan ser remplazados por combustibles obtenidos a partir de fuentes renovables.

Las microalgas parecen ser la única alternativa prometedora al cultivo de plantas para la producción de biodiesel. El cultivo de microalgas y la obtención de aceite a partir de éstas, presenta muchas ventajas con respecto a los cultivos terrestres. Por un lado, las microalgas presentan una tasa de crecimiento mucho mayor, no requieren de tierra arable por lo que no hay competencia con los cultivos utilizados para alimentación. De acuerdo con el cálculo hecho por Chisti (Chisti 2007) para cumplir tan solo con la mitad de la demanda en el transporte por biodiesel en los Estados Unidos se requeriría el 24% del total de la tierra cultivable para producir aceite de palma, mientras que se necesitaría solo el 2.5% del área cultivable existente para la producción de biodiesel con microalgas con 30% de aceite en su biomasa, además de que este porcentaje podría minimizarse al utilizar microalgas con mayor contenido de aceite en su biomasa.

Estos microorganismos tienen un mecanismo fotosintético en el que fijan el CO₂ del aire y convierten este carbono en carbohidratos y lípidos utilizables para la producción de biodiesel. Desde el punto de vista ambiental al fijar el CO₂ del aire ayudan en la disminución de la gran cantidad de CO₂ emitido por las fuentes industriales, además de utilizar como nutrientes Nitrógeno y Fosforo los cuales se encuentran en aguas residuales municipales e industriales. El mecanismo fotosintético de las microalgas es

más rentable comparado con la producción de aceites a partir de organismos heterotróficos que utilizan glucosa y otras fuentes de carbono (Lee et al. 2008). La producción de aceite por área está estimada entre 4.6 y 18.4 L/m², esto es de 7 a 30 veces más que la obtenida a partir de cultivos terrestres.

2. ANTECEDENTES

Como ejemplo comparativo, podemos decir que existen microalgas capaces de producir 130.000 litros de biodiesel por hectárea, mientras que si se cultivase la misma superficie con girasol, solo se obtendrían 952 litros, con soya 446 litros (Loera-Quezada and Olguín 2010)(Fig. 1).

El uso de biodiesel de microalgas libera una mínima cantidad de dióxido de sulfuro, óxido nitroso y otros contaminantes en comparación con el biodiesel derivado de petróleo. En base a lo anterior se puede decir que las microalgas son la mejor fuente de biodiesel capaz de sustituir al petróleo.

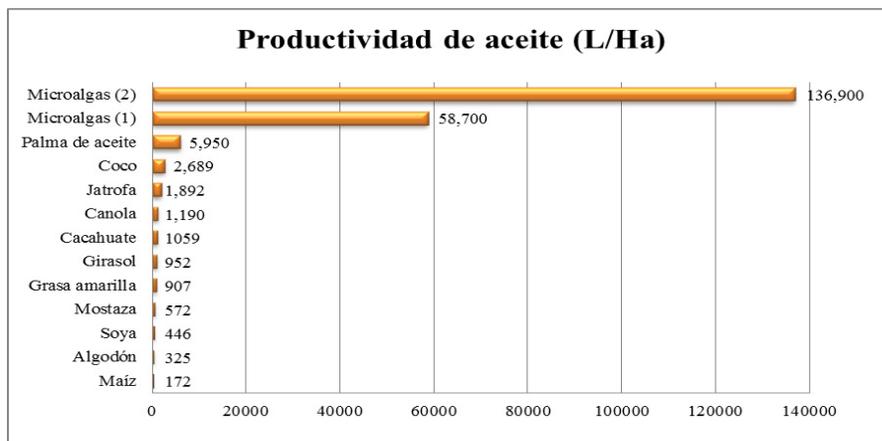


Fig.1.- Productividad de aceite de las microalgas en comparación con los cultivos convencionales (Chisti 2007; Schenk et al. 2008; Gao et al. 2012). (1) 30% de aceite en biomasa (con base a peso seco); (2) 70% de aceite en biomasa (con base a peso seco).

2.1 Cosecha de microalgas: Etapa sustancial para el proceso de producción de biodiesel

La producción de biocombustible derivado de microalgas tiene cuatro etapas principales: crecimiento, cosecha, extracción y conversión. Cuando se produce biodiesel el objetivo general es conseguir la mayor producción de biomasa mediante un sistema simple y con el menor costo posible. El microorganismo más adecuado entonces debe tener como

características: una alta tasa de crecimiento, alto contenido de lípidos, requerir medios simples de crecimiento, y ser tolerante a amplios rangos de condiciones ambientales (Murray et al. 2011).

Existen dos principales limitaciones de energía y costo para la producción a gran escala de biomasa microalgal: a) Los actuales cultivos de microalgas con altos costos de enfriamiento, aeración y mezclado; b) La necesidad de centrifugas de alta velocidad para la cosecha de biomasa. Existe una necesidad de sistemas eficientes pero de bajo costo que permita la cosecha de microalgas de agua dulce y marinas; se han propuesto diversos métodos, uno de estos es el uso de materiales no tóxicos que faciliten por mecanismos fisicoquímicos la recuperación del microorganismo (Schlesinger et al. 2012).

Los retos científicos y tecnológicos que se requieren vencer para lograr disminuir los costos de producción de biomasa algal, así como de producción de biodiesel a costos competitivos, están relacionados a dar respuestas creativas y rentables para lograr: a) aumentar la productividad de biomasa microalgal con el mayor contenido de lípidos del perfil adecuado; b) lograr mayores rendimientos de biomasa microalgal en reactores que ofrezcan costos de inversión y de operación competitivos; c) diseñar nuevos procesos de cosecha de biomasa por medio de biofloculación o uso de cepas con capacidades intrínsecas de autofloculación (Loera-Quezada and Olguín 2010).

La problemática en la recuperación de biomasa microalgal y sus metabolitos está relacionada con aspectos como el tamaño pequeño de las células (2-20 μ diámetro) y el alto contenido de agua que debe ser removido, lo cual hace que la cosecha de las microalgas sea un proceso costoso, contabilizando aproximadamente del 20 al 30% o hasta el 52% del costo total de producción (Molina Grima et al. 2003; Greenwell et al. 2010; Olguin 2012).

Los métodos más comunes de cosecha de la biomasa microalgal incluyen centrifugación (especialmente en el caso de las microalgas unicelulares); sin embargo, es uno de los métodos de mayor costo además de que puede causar daño a las células, filtración cuando se han formado flóculos o se trata de microalgas o cianobacterias relativamente

grandes o filamentosas y en algunos casos, sedimentación por gravedad, flotación o técnicas de electroforesis. Sin embargo, la centrifugación es el proceso más costoso y generalmente se aplica sólo cuando se recuperan metabolitos de alto valor agregado (Uduman et al. 2010). En consideración a que la mayoría de las microalgas oleaginosas son pequeñas o no filamentosas, la filtración no es un método fácilmente aplicable a la producción de biodiesel a partir de microalgas (Loera-Quezada and Olguín 2010).

La efectividad de un proceso de separación sólido-líquido puede describirse en términos de eficiencia de recuperación (RF) y el factor de concentración (CF) (Lee et al. 2008). La eficiencia de recuperación se define como la relación de la masa de células recuperadas en el producto final con la masa total de células en el cultivo inicial. El factor de concentración es la relación de la concentración de biomasa de microalga en el producto final con respecto a la concentración inicial en el cultivo.

$$\text{Eficiencia de recuperación (RE)} = \frac{\text{masa de células recuperada}}{\text{masa inicial de células en cultivo}}$$

$$\text{Factor de concentración (CF)} = \frac{\text{concentración de microalga en producto final}}{\text{concentración inicial de microalga en cultivo}}$$

Las técnicas de recuperación de microalgas pueden ser utilizadas individualmente (etapa sencilla) o en combinación (multi-etapa), y la decisión depende usualmente de la especie de microalga de interés, la concentración del producto deseado y la calidad del producto. Las propiedades fundamentales de las microalgas que influyen en su recuperación son: a) forma de partícula (filamentosa, alargada, esférica, en cadena); b) tamaño de partícula (2 a 20 μ generalmente); c) peso específico; d) carga (usualmente negativa) (Pahl et al. 2013).

La sedimentación y floculación potencialmente ofrecen el menor gasto de energía para la cosecha de microalgas, sin embargo, al parecer no existe un método o combinación de métodos de recuperación específicos para todas las microalgas.

Milledge, (Milledge and Heaven 2012) reporta que el método más eficiente desde el punto de vista energético para recuperación de biomasa en la producción de biocombustibles no necesariamente está relacionado con el rendimiento máximo, sino

con concentraciones de biomasa que faciliten su recuperación y posterior extracción de lípidos.

2.2 Inducción de floculación para la cosecha de microalgas

La floculación es una técnica utilizada ampliamente en diversas industrias, su aplicación en la recuperación de biomasa microalgal se basa en la premisa de que las microalgas y cianobacterias tienen cargas idénticas en la superficie que ocasiona que se repelan unas a otras; los floculantes bloquean estas cargas dejando que las células se adhieran unas a otras generando flóculos (Schlesinger et al. 2012). Particularmente los cationes estimulan la actividad floculante al neutralizar y estabilizar las cargas negativas de los grupos funcionales formando puentes entre las células (Salehizadeh and Shojaosadati 2001).

Los agentes floculantes generalmente se clasifican en tres grupos a) Floculantes inorgánicos como sulfato de aluminio o cloruro de polialuminio (Duan and Gregory 2003); b) Polímeros sintéticos orgánicos como derivados de poliacrilamidas o polietileniminas (Zhang y Li 1999); c) Floculantes de origen biológico como quitosán y algunas macromoléculas extracelulares. Los biofloculantes pueden ser biodegradables y no tóxicos a microorganismos a diferencia de los floculantes orgánicos y los polímeros sintéticos orgánicos (Zouboulis et al. 2004).

2.3 Floculación Química

La floculación química, la cual se hace utilizando óxido de calcio, cloruro férrico, y/o polielectrolitos, es el método más común y general en la cosecha de microalgas, ya que es aplicable a la mayoría de estas células. Este método depende de la carga negativa de las paredes celulares de las microalgas, que es neutralizada por el floculante, lo que permite la formación de flóculos grandes que luego pueden ser recuperados por sedimentación o por flotación mediante inyección de flujo de aire. Sin embargo, estos

floculantes químicos pueden interferir con el procesamiento de la biomasa, así como en la digestión anaerobia de los efluentes generados en el proceso o en el reciclaje de nutrientes.

Durante el cultivo las microalgas liberan cantidades significativas de materia orgánica (17%), la cual interfiere con el mecanismo de floculación en presencia de biopolímeros como quitosán y almidón catiónico como agentes floculantes, debido a la interacción entre estos con las cargas polielectrolíticas de la materia orgánica presente en lugar de las cargas en la superficie celular de las microalgas, por lo que la demanda de agente floculante puede estar determinada por la cantidad de materia orgánica presente (Vandamme et al. 2012).

En la actualidad, el proceso de floculación tradicional que utiliza sales metálicas que contaminan la biomasa está siendo investigado por diversos grupos buscando realizar modificaciones que permitan disminuir las problemáticas antes mencionadas (Loera-Quezada and Olguín 2010).

2.4 Floculación química (adición de inorgánicos, quitosán y polielectrolitos)

La floculación inducida por el incremento de pH fue estudiada en microalgas de agua dulce como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp, *Chlorococum* sp. y microalgas marinas como *Phaeodactylum tricornutum* y *Nannochloropsis oculata*, por el grupo de investigación de Zechen Wu (Wu et al. 2012), proponen que el mecanismo involucraba la formación de un precipitado de hidróxido de magnesio y una neutralización de las cargas. Las microalgas de agua dulce comenzaron su aglomeración cuando el pH fue ajustado a 8.6 y durante su incremento hasta 10.6, la eficiencia alcanzó un 90%; en el caso de las microalgas marinas la aglomeración inició a pH 8.0 y 8.2 respectivamente.

En un estudio previo Vandamme evaluó el uso de almidón catiónico comercial para microalgas de agua dulce *Parachlorella* y *Scenedesmus*, así como para microalgas marinas *Phaeodactylum* y *Nannochloropsis*, siendo solo eficiente el almidón para las

microalgas de agua dulce, necesitando *Scenedesmus* aproximadamente un 50% menos floculante con respecto a *Parachlorella*. La ventaja del uso de estos polisacáridos (polielectrolitos) se basa en que por su naturaleza química no contaminan el medio de cultivo donde se encuentran las microalgas, además de que está aprobado para su contacto con alimentos y agua potable, en estos aspectos el almidón catiónico es similar al quitosán. Este almidón catiónico tiene un menor número de grupos funcionales por lo que la dosis requerida es mayor que la del quitosán sin embargo el almidón es más económico (Vandamme et al. 2009).

2.5 Biofloculación en microalgas

La biofloculación es un fenómeno que puede llevarse a cabo por la mezcla de microalgas que presentan la propiedad de autoflocular con microalgas de interés que no presentan esta característica o por la adición de compuestos de origen biológico como exopolisacárido como agentes floculantes que permiten la agregación celular.

Salim et al en el 2011, llevaron a cabo estudios sobre biofloculación utilizando tres microalgas con propiedad de autofloculación (*Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis suecica*, *Ankistrodesmus falcatus*) y dos microalgas no floculantes (*Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans*), concluyen que las tres microalgas floculantes promueven la eficiencia de la floculación con 25 a 40% en *Chlorella* y de 40 a 50% en *Neochloris*, sin embargo reportan que la cantidad necesaria de microalga floculante es relativamente alta para llevar a cabo el proceso de floculación, mencionando que se deben realizar estudios de optimización (Salim et al. 2011).

Finalmente la recuperación de una microalga de interés con una microalga con propiedad de autofloculación puede ser un método prometedor, ya que además del aumento en la eficiencia de recuperación, la presencia de la microalga autofloculante no interfiere en etapas posteriores del proceso (Salim et al. 2012).

2.6 Exopolisacáridos y su rol en floculación

En el caso de las cianobacterias, se ha determinado que los polisacáridos extracelulares (EPS), son heteropolímeros aniónicos complejos, que en su mayoría contienen ácido urónico, radicales acetilo, pirúvico o derivados sulfatados y otras moléculas peptídicas (De Philippis et al. 2001). Estos polímeros son responsables de la adhesión de cianobacterias durante la floculación. La composición exacta de los oligopolímeros varía de acuerdo con la especie. El hecho de que las superficies de las microalgas estén cargadas negativamente con polisacáridos, y en base al mecanismo de floculación descrito en trabajos anteriores podría sugiere que estos pueden ser utilizados como floculantes para la agregación celular.

La masa molecular de los EPS está entre los 2000 a 1600 KDa, y más del 75% de aquellos actualmente caracterizados son heteropolisacáridos, consistentes de seis o más tipos de monosacáridos. Más del 90% de EPS son aniónicos debido a la presencia de uno o dos ácidos urónicos y azúcares con grupo sulfato (Ohki et al. 2013).

De igual manera se reportan cuatro monosacáridos presentes en un polisacárido extracelular de *Dunaliella salina* los cuales fueron: galactosa, glucosa, xilosa y fructosa (Mishra and Jha 2009).

Botryococcus braunii es una microalga verde con potencial para sintetizar lípidos e hidrocarburos y con habilidad de producir EPS. Utilizando dos medios de cultivo: BG11 (con el doble de contenido de N, 1.5 g/L) y el medio D, se analizó la capacidad de producir EPS, así como la cantidad de biomasa producida. La cantidad más alta de producción de biomasa se obtuvo con el medio BG11, sugiriendo que se podría deber a la mayor cantidad de nitrógeno en este medio. Sin embargo en el medio D se obtuvo una mayor cantidad de EPS esto es atribuido a que este medio tiene la mitad de nitrógeno en comparación con el medio BG11 y debido a que el nitrógeno se vincula con procesos

fotosintéticos, la menor cantidad de nitrógeno suministrado por el medio de D, puede estar directamente relacionada con la mayor producción de EPS (Díaz Bayona and Garcés 2014). Se ha observado que en escasez de nitrógeno, el contenido de pigmentos fotosintéticos en la célula disminuye, y la tasa de fotosíntesis se reduce (Banerjee et al. 2002). *B. braunii* parece responder a esta condición mediante la degradación de macromoléculas que contienen nitrógeno y la acumulación de compuestos de reserva de carbono, tales como polisacáridos y grasas (Lupi et al. 1994). Otra posible causa de la mayor producción de EPS en el medio D es que contiene NaCl, el cual no es usado en el medio BG11, esto sugiere que un aumento en la salinidad del medio podría contribuir a la producción de EPS. El espectro de IR en ambos EPS mostró señales típicas de polisacáridos sin embargo el EPS producido en el medio BG11 no muestra dos picos de absorción (1921.52 y 720.6 cm^{-1}) que en el espectro del medio D si están presentes, lo que podría indicar una diferencia entre los grupos glicosil entre los EPS; la ausencia de grupos funcionales nitrogenados y esteres de sulfato en ambos EPS significa que no está compuesto por azúcares aminados ni sulfatados, y en lugar de estos grupos existen señales en el en el espectro de IR que corresponden a ácidos urónicos (Díaz Bayona and Garcés 2014).

2.7 Biofloculación mediante el uso de compuestos biofloculantes (EPS)

Varias microalgas exhiben el fenómeno de biofloculación que consiste en la agregación espontanea de células en flóculos grandes. Desafortunadamente los procesos de biofloculación aún no son bien comprendidos, dependen de la elaboración de polímeros por parte de las células de las microalgas que hacen que las células se adhieran unas con otras (Darzins, 2010).

Existen diversos estudios donde los exopolisacáridos provenientes no solo de microalgas sino de otros microorganismos como bacterias, hongos y levaduras son utilizados como agentes biofloculantes. Estos biofloculantes producidos por diferentes microorganismos

son principalmente biopolímeros de alto peso molecular como polisacáridos (Suh et al. 1997), glicoproteínas (Lee et al. 1995) y proteínas (Takeda and Hirokawa 1978).

La naturaleza de estas moléculas ha sido estudiada en hongos como *Aspergillus parasiticus*, el cual produce un biofloculante con una alta eficiencia para la floculación de caolín, así como con algunos colorantes solubles en agua como Azul 4 y Amarillo 25. Se reporta que la composición de este biofloculante es de 76.3% carbohidratos y 21.6% de proteína, con presencia de grupos amida, amino e hidroxilo. Una observación en este estudio, es que los grupos amino y amida en la molécula son de importancia para la efectividad de la floculación, desde el punto de vista de interacción electrostática (Deng et al. 2005). De igual manera Liu, analiza un biofloculante de alto peso molecular (3.0×10^5 Da) producido por *Penicilium* sp. el utilizar agentes floculantes de alto peso molecular afecta el área de adsorción, aumentando los puntos de estos con lo que se consigue una unión más fuerte y una actividad floculante mayor, los grupos funcionales presentes fueron fosfato, amino, hidroxilo y carboxilo (Liu et al. 2010).

Las bacterias heterotróficas a diferencia de las microalgas autótrofas, requieren una fuente de carbono orgánico adecuado como sustrato para el crecimiento, y este requisito pueden ser explotado sin afectar la productividad de biomasa de microalgas. Además el uso de EPS previene el riesgo de contaminación por compuestos inorgánicos pudiendo llegar a eficiencias similares a las de floculación química (Lee et al. 2008).

2.8 Autofloculación

Se sabe también que la floculación es particularmente sensible al pH, el incremento de pH mejora la capacidad de floculación de las células. La floculación por medio del incremento del pH puede ser una alternativa atractiva debido a que es una técnica de bajo costo y que a la vez elimina el uso de floculantes. Otra ventaja de este método es que el medio puede ser reciclado ya que no contiene otros floculantes como

contaminantes químicos, sin embargo este método ha sido probado en muy pocas cepas de microalgas (Wu et al. 2012).

En un estudio reciente con la microalga verde *Scenedesmus obliquus* con propiedad de autofloculación y de producción de EPS, se estudió el fenómeno de autofloculación y al ser caracterizado este exopolisacárido el componente principal fue glucosa seguido por manosa, galactosa, ramnosa y fructosa con una relación molar de 8:5:3:2:1 respectivamente. Además al añadir 25 mM de sales como Al^{3+} y Fe^{3+} la eficiencia de la floculación incremento en un 20%, no observando un efecto significativo al usar sales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ (Guo et al. 2013).

Las microalgas sintetizan y acumulan carbohidratos cuando son expuestas a diferentes situaciones de estrés, como la deficiencia de algún nutriente, estrés salino y otras represiones ambientales. Se encontró que para *Spirulina platensis* la limitación de fósforo como nutriente causa un incremento significativo en el contenido de carbohidratos, además se observó que la biomasa que era rica en carbohidratos floculaba sin la adición de algún agente floculante; se establece que la eficiencia en la biofloculación parece estar relacionada con el contenido de carbohidratos de la biomasa. En el contenido máximo de carbohidratos (60%) la biomasa floculó $68.49 \pm 7.73\%$ los primeros 15 min y alcanzó un máximo de $80.25 \pm 5.58\%$ a los 60 min. En esta investigación los autores mencionan que para sus conocimientos, esta es la primer vez que la biofloculación se relaciona a la concentración de carbohidratos (intracelulares) de la biomasa (Markou et al. 2012). El mecanismo bioquímico que podría explicar este comportamiento se basa en que la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa que controla la síntesis de carbohidratos es activada por la 3-fosfoglicerato y es inhibida por fósforo inorgánico. Cuando el fósforo inorgánico es bajo, la activación de la ADP-glucosa pirofosforilasa es elevado y más carbohidratos son sintetizados (Gomez-Casati et al. 2003).

Por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se sugiere que la floculación puede estar asociada a una sustancia presente en la pared celular de la cepa JSC-7, ya que también se realizaron estudios utilizando el sobrenadante de esta cepa sin tener actividad floculante para las cepas *C. vulgaris*

CNW11 y *S. obliquus* FSP. Se extrajeron 47 mg del agente floculante a partir de un cultivo de 4 L de la cepa *C. vulgaris* JSC-7 con una densidad óptica de OD₆₉₀ 0.7. En la caracterización de este agente floculante se observó que en el espectro de FTIR aparecía un pico de absorción a 1238 cm⁻¹, la región 1250 y 1200 cm⁻¹ corresponde a P=O, este pico ha sido observado en la cianobacteria *Calothrix* sp. y el alga café *Padina tetrastomica* sin embargo nunca había sido reportado en una microalga verde. El grupo funcional fosfodiéster en *Calothrix* sp. y *P. tetrastomica* mostraba propiedades de quelación fuertes. El pico en *C. vulgaris* sugiere que los polisacáridos asociados a la pared celular podrían contener PO₂- fosfodiéster; la presencia del ion fosfato fue detectada y cuantificada obteniendo un 0.038% para este enlace. Los monómeros del agente floculante consistieron en glucosa, manosa y galactosa. Este estudio proporcionó el primer ejemplo de polisacárido en microalga que contiene fosfodiéster. Además de ser el primer reporte sobre un agente floculante producido por una *Chlorella* sp. autofloculante (Alam et al. 2014).

En uno de los estudios más recientes por Rakesh, se evaluaron floculantes orgánicos e inorgánicos, así como la floculación inducida por pH en siete microalgas (1 *Chlamydomonas*, 2 *Chlorella* sp. 1 *Chlorella sorokiniana*, 2 *Botryococcus*, 1 *Chlorococcum*). Se concluyó que de entre los floculantes inorgánicos evaluados, el cloruro férrico fue el más favorable con una eficiencia de floculación del 87.6% en una concentración de 600 µM; entre los floculantes orgánicos, el almidón de arroz fue el de mejor resultado con una eficiencia del 86% en una concentración de 90 mg L⁻¹. Sin embargo, al realizar un estudio económico, en comparación de costos entre floculantes inorgánicos (FeCl₃) y orgánicos, el almidón de arroz es más barato además de ser una opción más segura para el medio ambiente. En relación al aumento de pH, la floculación se vio inducida hasta un 80% en valores de pH 10 y 11 dependiendo la especie de microalga, otro punto importante es que el medio podría ser neutralizado y reutilizado después de agregar nutrientes reduciendo el costo y demanda de agua a gran escala (Rakesh et al. 2013).

El uso de efluentes de residuos tratados anaeróbicamente como una fuente de nutrientes se ha destacado como una estrategia económica para reducir el costo de producción de

microalgas (Olguín 2012), además de poder reducir el costo de su recuperación; como se demuestra en el estudio de Olguín (2015), donde se reporta un 42% de eficiencia en floculación de *Neochloris oleoabundans*, cultivada en efluentes anaerobios de vinaza, provenientes de la industria del alcohol, los cuales fueron tratados con cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) en donde se sugiere que debido a la presencia de iones Ca^+ provenientes de la cal junto con el pH alcalino al finalizar el cultivo podrían ser factores inductores de un alto grado de floculación; se reporta una concentración de 565.4 mg/L de Mg^+ y 164 mg/L de Ca^+ presentes en la vinaza digerida (Olguín et al. 2015).

El conocimiento sobre cómo las propiedades de las células cambian durante las fases de crecimiento es un factor importante, ya que podría ayudar a entender el comportamiento de autofloculación y así determinar el tiempo óptimo de cosecha. Estas propiedades fueron analizadas durante el crecimiento de *Ettlia texensis* y se estudió su comportamiento de autofloculación, se realizó una comparación de las células por microscopía electrónica de barrido (SEM) al final de la fase exponencial y al final de la fase estacionaria; en los resultados se observa que la superficie de las células estaba cubierta de EPS al final de la fase estacionaria y que una menor cantidad de EPS se encontraban en la superficie de las células al final de la fase exponencial. De igual manera las cantidades de proteína aumentaron considerablemente de la fase exponencial a la fase estacionaria. Este estudio demostró la importancia del tiempo de recolección de la biomasa para la producción factible de biodiesel a partir de microalgas. Sin embargo, el tiempo óptimo de cosecha será dependiente de la cepa que se utilice, siendo necesarios estudios para una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la acumulación de lípidos durante las diferentes fases de crecimiento, realizando estudios de forma simultánea del efecto en las fases de crecimiento sobre los cambios de la estructura celular para lograr la optimización de la cosecha y la extracción de lípidos de valor industrial (Salim et al. 2013).

2.9 Neochloris oleoabundans

Neochloris oleabundans (Fig. 2) es una microalga de agua dulce, con un diámetro entre 3 y 6 μ que ha sido reportada con una alta tasa de crecimiento (Gouveia et al. 2009) y alto contenido de lípidos de entre el 40% y hasta el 80% en condiciones de estrés (Pruvost et al. 2009); estos estudios muestran que *N. oleabundans* presenta un potencial uso como materia prima en la biomasa para producción de biodiesel. Además se ha demostrado el crecimiento y la acumulación de lípidos de *N. oleoabundans* a diferentes pH alcalinos (8 y 10), teniendo resultados favorables en cuanto al contenido lipídico de esta microalga para la producción de biodiesel bajo estas condiciones de cultivo (Santos et al. 2012).

Wu nan y colaboradores reportaron por primera vez la capacidad de *Neochloris oleoabundans* para producir grandes cantidades de un exopolisacárido de alta viscosidad usando lactosa como única fuente de carbono bajo condiciones controladas de iluminación. En los estudios preliminares de la optimización se obtiene una producción de 5.0 g/L, sobresalientemente más alto que cualquier polímero producido por alguna microalga reportada. Accidentalmente descubrieron la capacidad de *N. oleoabundans* para producir grandes cantidades de polímeros, mientras hacían estudios de factores de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo p. ej. fotoautótroficas, mixotróficas y heterotróficas, usando glucosa, lactosa o CO₂ como fuentes de carbono. Los autores mencionan que la única condición que permitió una producción substancial de polímero fue la mixotrófica, utilizando lactosa como fuente de carbono, en la que un gel fue producido al 3er día de cultivo. No se detectaron polímeros en los cultivos fotoautótrofos ni heterotróficos. Y en el cultivo mixotrófico utilizando glucosa como fuente de carbono tampoco hubo producción del polímero, lo que sugiere que la lactosa es un precursor para la biosíntesis de este polímero. Los resultados del peso molecular indican que es un polímero de 505kDa. Las propiedades de viscosidad y reológicas sugieren que este polímero puede ser utilizado en una amplia variedad de campos, incluyendo la alimenticia, cosmética e industria petrolera (Wu et al. 2011).

Para la cosecha de *Neochloris*, se ha reportado que puede ser utilizado quitosan en una dosis de 100 mg/L, en esta investigación se llevó a cabo un estudio sobre floculantes químicos para *Neochloris oleoabundans* (quitosan, aluminio y sulfato férrico) siendo el

quitosan el más efectivo, el aluminio fue inefectivo al contrario de lo reportado para otras microalgas. Se menciona en este artículo también que los intentos por flocular la microalga solo por aumento de pH fueron insuficientes, por lo que una neutralización de cargas por sí sola no es efectiva para el proceso de floculación de *Neochloris*. De lo anterior se dedujo que el mecanismo de floculación con el quitosan consiste en la adsorción del polímero seguida de una neutralización de las cargas en la superficie celular (Beach et al. 2012).

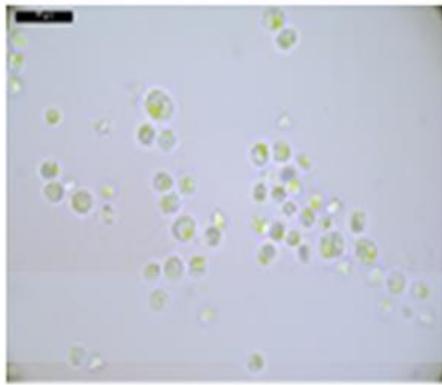


Figura 2.- *Neochloris oleoabundans* imagen de microscopio x100 (Olguín et al. 2015)

2.10 *Chlorella* sp.

Es un género de microalgas de la familia Chloropyta, midiendo de 2 a 10 μm de diámetro. La floculación espontánea de *Chlorella vulgaris* JSC-7 fue investigada, y se caracterizó el agente. Esta microalga autofloculante fue comparada con otras microalgas que no presentaban el fenómeno de autofloculación, (*Chlorella vulgaris* CNW11 y *Scenedesmus obliquus* FSP) la cepa JSC-7 exhibió una mayor eficiencia de floculación con un 76%. Al momento de añadir la cepa floculante a los cultivos de las microalgas no floculantes *C. vulgaris* CNW11 y *S. obliquus* FSP ésta facilitó la floculación aumentando sus eficiencias en 68.3% y 62.7% respectivamente de un 25.6% y 28.1% observado en los cultivos originales de estas cepas no autofloculantes. Una característica

interesante es que este fenómeno para la cepa JSC-7 no es dependiente de pH como se ha reportado en varias publicaciones (Alam et al. 2014).

Vandamme (2012) utilizando *Chlorella vulgaris* evaluó el rol del magnesio y calcio en la floculación inducida por el aumento de pH, encontrando que la sal más efectiva era el hidróxido de magnesio ya que inducía la floculación a un pH más bajo (9.7). Sin embargo, la cantidad requerida fue considerada relativamente alta (27 mg g⁻¹ de biomasa). Por otro lado, otras sales fueron estudiadas como el carbonato de sodio, el cual no indujo floculación; en el caso de hidróxido de potasio e hidróxido de calcio ambos indujeron floculación al mismo pH (10.8), sin embargo, en base a los costos de estas sales es recomendado el uso de hidróxido de calcio (Vandamme et al. 2012).

En reportes previos dos polisacáridos fueron purificados de *Chlorella pyrenoidosa*, donde se encontró que su composición estaba constituida principalmente por manosa y glucosa siendo manosa el monómero en mayor proporción comprendiendo cerca del 76.5-78% (Shi et al. 2007).

3. JUSTIFICACION

Uno de los principales problemas en la producción de biodiesel a partir de microalgas es el alto costo de la cosecha que va del 20-30% del costo total en la producción. Sin embargo, la mayoría de los estudios relacionados con la producción de biocombustibles en diversas especies de microalgas están enfocados en la producción de biomasa y su composición, poco se ha estudiado sobre los carbohidratos en cuanto a su rol vinculado a la floculación celular, a pesar que se ha propuesto que la recuperación rentable de microalgas puede ser considerada como el área más problemática de la producción de biocombustibles. El estudiar si existe la producción de exopolisacaridos, así como una diferencia en los carbohidratos presentes en estos exopolisacaridos, podría brindar información sobre el uso de estos en el proceso de recuperación de biomasa de microalgas, específicamente con alto contenido de lípidos.

4. HIPOTESIS

La microalga *Neochloris oleoabundans* cultivada en un medio de efluente anaerobio de vinazas puede producir exopolisacáridos que están vinculados en el proceso de floculación de la misma.

5. OBJETIVOS

Estudiar la presencia y realizar la extracción de exopolisacáridos (EPS) en *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella* sp. cultivadas en medio BBM, efluente anaerobio de vinazas (EAV) y BBM 3N/-N proporcionadas por el INECOL, para su caracterización parcial.

Estudiar la presencia y realizar la extracción de exopolisacáridos (EPS) de biomasa fresca, en consorcios de microalgas cultivados en medios LC y BBM modificado

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Biomasa seca

Identificar la presencia de EPS de las microalgas *N. oleoabundans* y *Chlorella* sp.

Realizar la extracción de los EPS de las microalgas *N. oleoabundans*, *Chlorella* sp.

Caracterizar parcialmente la composición del EPS:

- Carbohidratos totales
- Azúcares neutros
- Ácido urónico
- Proteínas

Conocer la composición monomérica de los azúcares presentes en los EPS extraídos de las microalgas analizadas tipo biomasa seca.

Biomasa fresca

Determinar la eficiencia de floculación de los consorcios cultivados en diferentes medios.

Conocer la composición monomérica de los azúcares presentes en los EPS extraídos de las microalgas analizadas tipo biomasa fresca.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Medios de cultivo

Las microalgas fueron proporcionadas por el Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz, México (INECOL), en donde fueron cultivadas por 21 días en fotobioreactores de placa plana (FPPs) con un volumen de trabajo de 4 L, *Neochloris oleoabundans* fue cultivada en medio basal bold (BBM) modificado (NH₄ como fuente de nitrógeno) y un medio a partir de efluente anaerobio de vinazas (EAV) recolectado y caracterizado por el INECOL; 6% (v/v) de vinaza diluida en agua destilada. Y *Chlorella* sp. fue cultivada en medio BBM en dos etapas, la primera consistió en una concentración de tres veces la cantidad de nitrógeno (3N) por 16 días seguida de una etapa de ausencia de nitrógeno (-N) por 13 días; ambas microalgas fueron recuperadas por centrifugación y secadas a 60°C por 12 h. La composición del medio de cultivo BBM modificado fue la siguiente: 250 NaNO₃, 25 CaCl₂·2H₂O, 75 MgSO₄·7H₂O, 75 K₂HPO₄, 175 KH₂PO₄, 25 NaCl, 11.42 H₃BO₃, 8.82 ZnSO₄·7H₂O, 1.44 MnCl₂·4H₂O, 0.142 NaMoO₄·6 H₂O, 1.57 CuSO₄·5H₂O, 0.49 Co(NO₃)₂·6H₂O, 50 Na₂EDTA, 3.1 KOH, 4.98 FeSO₄·7H₂O, and 1 μL H₂SO₄ concentrado (unidades expresadas en mg L⁻¹) (Olguín et al. 2015).

Para el análisis de exopolisacárido (EPS) de las microalgas proporcionadas por el INECOL se realizaron los siguientes estudios.

Del total de muestra de cada microalga se separaron 50 mg para realizar la hidrólisis de la biomasa, el restante se dividió en tres partes para la extracción por triplicado de EPS (tabla 1).

Tabla 1.- Biomasa de microalgas del INECOL

Microalga	Biomasa hidrolisis	Biomasa Extracción	Vol. Buffer mL	Vol. Etanol mL
BBM (<i>N. oleoabundans</i>)	50 mg	167 mg	5	15
EAV (<i>N. oleoabundans</i>)	35mg	51.5 mg	1.54	4.6
RA (<i>Chlorella</i> sp.)	50 mg	292 mg	8.8	26.4
RB (<i>Chlorella</i> sp.)	50 mg	408 mg	12.25	36.7

7.2 Tinción de capsula

El propósito de la tinción de rojo Congo es hacer evidente la presencia de una capsula extracelular de polisacáridos. La biomasa seca es resuspendida en buffer fosfato salino (PBS) 0.15 M pH 7.3 por 60 min. Se toma una alícuota y se coloca en un portaobjetos, a la que se agregan 2 gotas de rojo Congo, se deja secar a temperatura ambiente para después colocar solución de Maneval (mordente de capsula) por 2 min. Se lava el portaobjetos y se deja secar para después observar en microscopio.

7.3 Extracción de EPS

La extracción de EPS se realizó por el método utilizado por Chaiklahan con algunas modificaciones en el volumen total de etanol para precipitado, utilizando 3 volúmenes en lugar de 1.

Se resuspendió la biomasa en buffer PBS pH 7.4 0.15 M por 24 h en agitación lenta. Al término de la agitación se colocaron las muestras en baño de agua para tratamiento térmico por 2 h a 90°C. Se centrifugaron las muestras a 7000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto y se dejaron las muestras en refrigeración por 24 h.

Después de las 24 h, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min a 4°C y se recuperó el precipitado el cual fue colocado en tubos eppendorf previamente pesados

para determinar el rendimiento en peso seco del producto obtenido. Se dejaron a 60°C para la evaporación de etanol, posteriormente se pesaron para obtener el rendimiento (Fig. 3) (Chaiklahan et al. 2013).

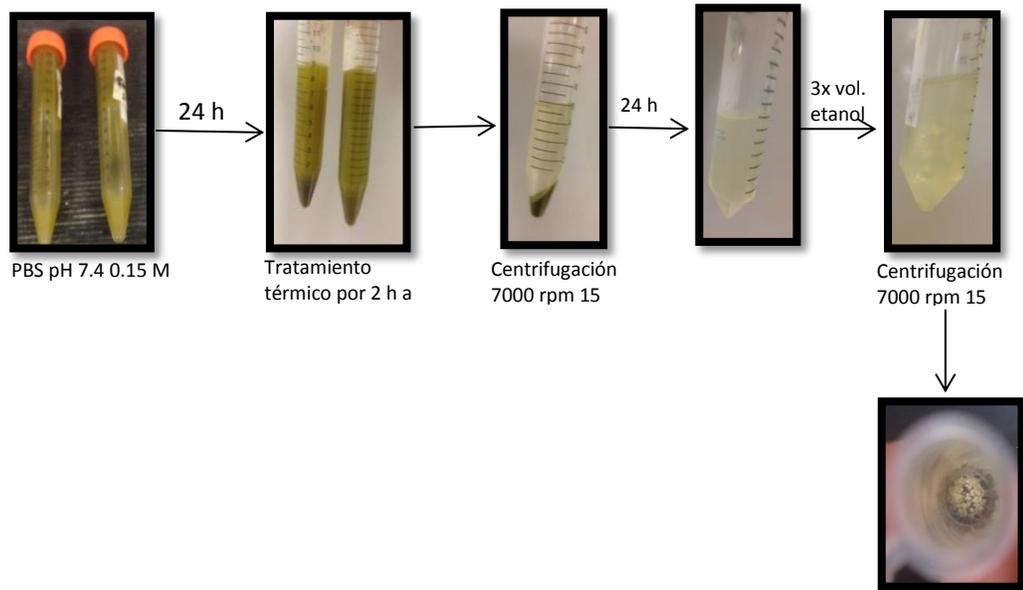


Fig. 3.- Metodología de extracción de EPS por método Chaiklahan (Chaiklahan 2013).

7.4 Hidrólisis de pared celular

A la biomasa seca sin realizar tratamiento (BS) y a la biomasa de los precipitados después de la extracción de EPS (BDE) (tabla 2), se le adicionaron 500 μL de ácido sulfúrico (concentrado), posteriormente cada 15 min las muestras se agitaron por un tiempo final de 1 h. A los tubos se les adicionó 11.5 mL de agua destilada y se llevaron a

autoclave (121 °C) por 1 h. Transcurrido el tiempo las muestras se aforaron a 25 mL y filtradas (filtro de poro abierto). Las muestras se resguardaron en refrigeración hasta su análisis.

Tabla 2.- Biomasa utilizada para hidrolisis

Microalga	Biomasa (mg)
BBM biomasa seca (BS)	20.4
BBM (BDE)	20.7
EAV biomasa seca (BS)	16.5
EAV (BDE)	19.6
RA biomasa (BS)	20.4
RA (BDE)	21
RB biomasa seca (BS)	19.9
RB (BDE)	20.1

7.5 Cuantificación de Azúcares

Para la cuantificación de azúcares se utilizaron los hidrolizados de la biomasa; para las muestras de EPS estos se disolvieron en 2 mL de agua destilada.

7.6 Azúcares Totales

Se cuantificaron azúcares totales por el método Dubois, 20 μ L de muestra hidrolizada y 30 μ L de EPS fueron colocados en 230 μ L y 220 μ L de agua destilada respectivamente. Utilizando glucosa como estándar.

Se adiciono 250 μ L de fenol 5% y se colocaron los tubos en hielo para después agregar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (directamente a la muestra). Las muestras se colocaron en baño de agua en ebullición (\approx 100°C) por 5 min. Al termino del tiempo de incubación se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se las absorbancias fueron registradas a 490 nm (DuBois et al. 1956).

7.7 Azúcares Neutros

La cuantificación de azúcares neutros se realizó por medio del método de Souty, se utilizaron 20 μL de muestra hidrolizada y 30 μL de EPS, a los cuales se les añadió 230 μL y 220 μL de agua destilada respectivamente. Utilizando glucosa como estándar.

A las muestras se les añadió 1 mL de orcinol y se incubaron en baño de agua en ebullición ($\approx 100^\circ\text{C}$) por 5 min. Al término de la incubación se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se registraron las absorbancias a 420 nm (Souty et al. 1980).

7.8 Ácidos Urónicos

La cuantificación de ácidos urónicos se realizó por el método de carbazol. Se tomaron 100 μL de cada muestra (hidrolizado y EPS) y se añadieron 150 μL de agua destilada. Se utilizó carbazol como estándar.

A las muestras se les agrego 1.5 mL de tetraborato de sodio 0.025M en ácido sulfúrico concentrado, se incubaron en baño de agua en ebullición ($\approx 100^\circ\text{C}$) por 10 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se añadió posteriormente 50 μL de carbazol y se incubaron nuevamente en baño de agua en ebullición ($\approx 100^\circ\text{C}$) por 15 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para registrar la absorbancia a 535 nm (Bitter and Muir 1962).

7.9 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas se realizó por el método Bradford utilizando como estándar suero de albumina bovina.

Se tomaron 1.5 mL de reactivo Bradford y se añadió 500 μ L de muestra, se agita en vortex y se deja incubar de 5-45 min; para después leer a 595 nm (Bradford 1976).

7.10 Análisis de FTIR

Se realizó un análisis de espectroscopia por infrarrojo FTIR a los productos obtenidos de la extracción de EPS utilizando el equipo Thermo Scientific Nicolet iS10 en un rango de longitud de onda de 4,000 – 500 cm^{-1} .

7.11 Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS)

Hidrolisis y derivatización de muestras.

Para llevar a cabo el análisis de CG-MS, las muestras son previamente hidrolizadas y derivatizadas. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento: para la hidrolisis de las muestras y los estándares, estas últimas se prepararon a diversas concentraciones (tabla 3).

Tabla 3.- Concentraciones de estándares utilizados para análisis CG-MS

Estándar	Concentración mg/ml
Glucosa	1-2-3-4-5
Galactosa	1-2-3-4-5
Xilosa	1-2-3-4-5
Arabinosa	1-2-3-4-5
Ramnosa	2-4-6-8-10
Fucosa	2-4-6-8-10
Manosa	2-4-6-8-10

De las soluciones preparadas se tomó 1 mL, se le adicionó 1 mL de H₂SO₄ 2 M y se agitó vigorosamente en vortex. El material se colocó durante 3 h a 100°C, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se llevó a resguardar a refrigeración. La derivatización se llevó acabo de acuerdo al método descrito por Albersheim (1967). De las muestras obtenidas en el punto anterior, se tomó 1 mL y se le adicionó 0.2 mL de NH₄OH a 33% para alcanzar un pH \geq 9. Enseguida se le añadió 0.1 mL de una solución de NH₄OH 3 M que contiene 100 mg NaBH₄/mL, el material se agitó y se dejó incubar por 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron en baño de hielo y se añadió 0.05 mL de CH₃COOH. Una vez agitado el material y teniendo precaución de la generación de vapores, nuevamente se adicionaron 0.05 mL de CH₃COOH. De esta solución se tomaron 300 μ L, se añadieron 200 μ L de N-metilimidazol y 3 mL de Ac₂O para dejar en incubación a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente en baño de hielo se agregaron 5 mL de H₂O y 5 mL de CH₂Cl₂ seguido de una agitación en vortex. Se remueve el H₂O y se realizan 3 lavados utilizando 5 mL de NaHCO₃ 0.2M. Finalmente se transfiere la fase orgánica (CH₂Cl₂) en un tubo nuevo donde se deja evaporar para una posterior inyección (Albersheim et al. 1967).

7.12 Condiciones de análisis

Los azúcares y muestras que fueron derivatizados de acuerdo a la metodología previamente descrita. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas Varian CP-3800, utilizando una columna capilar VF-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).

Para obtener las mejores condiciones para la separación de los azúcares analizados, se realizaron diversas corridas cromatográficas considerando los siguientes parámetros: volumen de flujo, rampa de temperatura, permanencia de temperatura, con y sin Split. Considerando las condiciones de análisis anterior, el método que se utilizó para las corridas fue el que se presenta en la tabla 4. El volumen de inyección fue de 1 μ L de la

muestra, las cuales previo a la inyección en el equipo se filtraron por membranas de 0.22 μm ; temperatura del inyector 250 $^{\circ}\text{C}$, helio como gas acarreador con flujo 1.5 ml/min; ionización: impacto de electrón 70 eV, temperatura de la fuente de ionización 200 $^{\circ}\text{C}$; modo de adquisición: escaneo de m/z 40 a m/z 650; retraso de solvente 4.0 min.

Tabla 4. Condiciones de corrida de cromatografía de gases acoplado a masas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa de temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Permanencia	Tiempo total (min)
120	-	2	2.0
170	20	0	4.5
190	5	0	8.5
220	20	0	10
250	2.5	3	25
300	20	0	27.5

7.13 Microalgas y medios de cultivo de consorcios (biomasa fresca)

Se analizaron tres distintos consorcios de microalgas proporcionados por el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas (LICA) de la UANL. Estos consorcios fueron previamente estudiados y seleccionados por su capacidad de remover N y P en aguas residuales. El crecimiento y la eficiencia de floculación de los consorcios de microalgas fueron estudiados cultivándolos en dos medios de cultivo; en fotobiorreactores cilíndricos con un volumen de trabajo de 15 L por 27 días.

El primer medio utilizado fue, medio basal Bold (BBM) con modificación en el cambio de fuente de NaNO_3 a NH_3 como fuente de N. El segundo medio utilizado fue nombrado LC, el cual es desarrollado por el LICA, actualmente en registro de patente. La composición elemental de ambos medios se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Composición elemental de los medios de cultivo.

Nutriente	Medio BBM-NH ₄ (mg/L)	Medio LC (mg/L)
K	85.655	235
P	52.7	31
N	41.127	246
C	35.21	2
Cl	27.665	0.7
Na	15.991	0.9
S	11.48	65
Mg	7.39	49
Ca	6.80	250
Zn	2.005	0.05
B	1.99	0.5
Mn	0.399	0.5
Cu	0.399	0.02
Co	0.0991	
Mo	0.0563	0.01
Fe	N/A	1

La concentración inicial de inoculo de los consorcios fue ajustada a 316 mg/L (tabla x). Las condiciones de cultivo fueron 30 °C±2, con suministro de aire proporcionado por piedras de aireación con un flujo de 0.06 vvm; agitación a 100 rpm utilizando propelas de 2 cm de diámetro, con una iluminación a cargo de luces LED alrededor del fotobioreactor otorgando una iluminación de 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie del reactor con un fotoperiodo de 24 h:0 h, los fotobioreactores se forraron con aluminio para aislar de luz solar los cultivos y solo utilizar la longitud de onda de las luces LED (figura 4).

Tabla 6.- Ajuste de inoculo de los consorcios de microalgas utilizados.

Consortio	Volumen (ml)	Peso seco (g/L)	Ajuste a g/L por medio	Volumen final (mL)
01A	700	1.22 ±0.07	0.316	259.77
12A	755	1.84 ±0.01	0.316	171.67
PTAR	900	0.632 ±0.02	0.316	427.50



Fig. 4.- Construcción de los biorreactores para cultivo de consorcios.

7.14 Determinación de crecimiento de biomasa por peso seco, pH, conductividad y consumo de nutrientes.

El crecimiento de la biomasa de los consorcios se determinó en base a su peso seco, por medio de la técnica de Pruvost; para la cual se tomaron cinco alícuotas de 10 mL como se muestra en la figura 5 y mezclándolas para crear una muestra homogénea de 50 mL del cultivo, esto se realizó cada tercer día. De la muestra homogénea se filtraron 10 mL de medio en papel filtro Whatman GF/C 1.2 μm de diámetro de poro, previamente secado y pesado; para dejar en secado por 24 h a 105 °C y pesar nuevamente para determinar por diferencia de peso la biomasa de los consorcios (Pruvost et al, 2009). El pH y conductividad se determinaron cada tercer día con el potenciómetro Corning Pinnacle 542. El consumo de nutrientes P y N se monitoreó utilizando kits comerciales API.

Fosforo: Producto #63L Lote #63A0413
Nitrato: Producto #LR1800 Lote #17A1210
Amonio: Producto #LR8600 Lote #83A0413

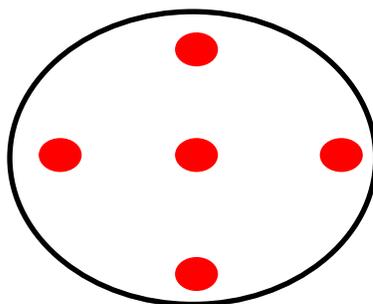


Fig. 5.- Toma de alícuotas para determinación de peso seco.

7.15 Eficiencia de floculación

La eficiencia de floculación (EF) se determinó de acuerdo al método de Sirin (Sirin et al, 2012). Se tomaron 100 mL de medio de cultivo a los 0-7-10-21 días; se agitaron a 150 rpm por 2 min para posteriormente verter en una probeta, se tomaron muestras a los 15 y 30 min, en dos distintas profundidades de la probeta, 1/3 y 2/3 como se muestra en la figura 6, para después medir en espectrofotómetro a una densidad óptica de 660 nm. Los datos de densidad óptica registrados fueron usados para calcular la eficiencia de floculación de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Eficiencia de floculación (\%)} = \left(1 - \frac{A - C}{B - C}\right) \times 100$$

Donde A es la densidad óptica de la muestra después del tiempo de asentamiento, B es la densidad óptica inicial de la muestra, y C es la densidad óptica del cultivo (sin microalga).

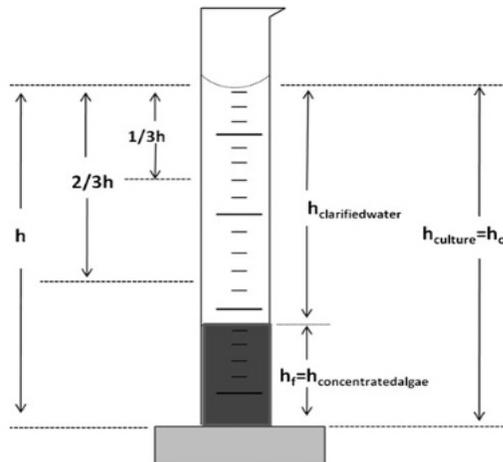


Fig. 6.- Diagrama de ensayo para eficiencia de floculación.

7.16 Procedimiento para la extracción de EPS

Se siguió el método utilizado por Chaiklahan como en biomasa seca con algunas modificaciones en el volumen total de etanol para precipitado, utilizando 3 volúmenes en lugar de 1.

Se tomaron 50 mL de cultivo y se llevaron a tratamiento térmico por 2 h a 90°C. Se centrifugaron las muestras a 7000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto y se dejaron las muestras en refrigeración por 24 h.

Después de las 24 h, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min a 4°C y se recuperó el precipitado el cual fue colocado en tubos eppendorf previamente pesados para determinar el rendimiento en peso seco del producto obtenido. Se dejaron a 60°C para la evaporación de etanol, posteriormente se pesaron para obtener el rendimiento el cual se expresó en g/L de biomasa (Chaiklahan et al, 2013).

7.17 Caracterización de los EPS de los consorcios de microalgas

Se realizaron las mismas técnicas de caracterización de carbohidratos llevadas a cabo en la biomasa seca.

7.18 Análisis de EPS por FTIR y cromatografía de gases GC/MS

Las muestras se analizaron siguiendo la misma metodología para biomasa seca.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta ahora la biosíntesis de exopolisacaridos en microalgas es muy poco estudiada (Alam et al. 2014). La composición de EPS varia incluso de especie a especie, y en algunos casos dentro de la misma especie puede ser afectada por las condiciones de crecimiento, uno o varios factores ambientales (Rossi and De Philippis 2016).

8.1 Tinción de capsula

La capsula de EPS no fue completamente visible en *N. oleoabunans* en medio BBM (A) sin embargo en el medio EAV es posible observarla con mejor claridad (B); mientras que para *Chlorella* sp. en medio BBM 3N/-N se observó en una mayor cantidad de

células (C) (Fig. 7). La presencia de capsula, una estructura asociada a las células de algunos microorganismos y que está constituida por EPS, ha sido observada por diferentes técnicas de tinción como rojo Congo y tinción negativa, en la cual los EPS se observan como una masa mucosa rodeando a una célula o grupos de células. Se pueden adherir a células y/o ser liberados al medio, algunas de mayor manera (De Philippis et al. 1998; Wotton 2004).

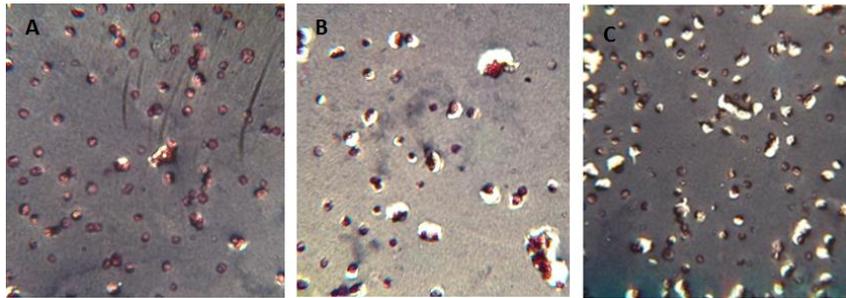


Fig 7.- Presencia de capsula (EPS) en células de *Neochloris oleabundans* y *Chlorella* sp.. tinción de rojo Congo; *N. oleabundans* medio BBM (A); medio EAV (B); *Chlorella* sp. medio BBM (BBM 3N/-N) (C), 100 X.

8.2 Extracción de EPS

El rendimiento de compuesto extracelular de las microalgas cultivadas y proporcionadas por el INECOL, se presenta en la tabla 7. Los resultados del rendimiento son expresados en peso seco de exopolisacárido por peso seco de biomasa. En donde se observa que el mayor rendimiento es obtenido por *Neochloris oleabundans* en el medio EAV (0.120 g/g), seguido de *Chlorella* sp. RB (0.100 g/g), mientras que en BBM y RA se obtuvieron rendimientos 3.6 y 4.1 veces menores que EAV, respectivamente. El medio EAV contiene menos nitrógeno (28.34 mg/L) en comparación con el medio BBM (41.18 mg/L). Los EPS en *Chlorella* sp. pudieran empezar a formarse en la segunda etapa de cultivo; cuando hay ausencia de nitrógeno. Esto también puede ser observado en los resultados de Boonchai, donde se encontró que una mayor cantidad de EPS (liberado y

pegado a la célula) pudo ser extraído bajo condiciones de ausencia de nitrógeno (Boonchai et al. 2015) . Del EPS de las microalgas *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella* sp. fue extraído y se observó que la producción de estos fue más evidente en los medios con menor contenido de nitrógeno, lo que coincide con reportes en donde estas mismas condiciones de estrés promovieron la producción de EPS (Kumar et al. 2007). Así mismo en una revisión reciente, en déficit de nitrógeno ocho cepas mostraron un incremento tanto intracelular como extracelularmente de carbohidratos mientras que otras cinco cepas mostraron una acumulación significativa de carbohidratos intracelulares (Rossi and De Philippis 2016). De igual manera para la microalga verde *Botryococcus braunii* bajo condiciones de déficit de nitrógeno diversas actividades metabólicas se reducen, el contenido de pigmentos fotosintéticos en las células decrece, y la velocidad de fotosíntesis baja (Banerjee et al. 2002), estas condiciones junto con altas concentraciones de sales son factores involucrados en la producción de EPS y biomasa (Díaz Bayona and Garcés 2014). Existe variación entre los rendimientos de EPS reportados, con rangos desde 4.5 a 105 mg/L para cepas de cianobacterias, incluso utilizando diferentes fuentes de carbono en el medio (Singh and Das 2011; Ding et al. 2012).

Tabla 7. Rendimiento de compuesto extracelular de microalgas.

Microalga	Rendimiento g/g
BBM (<i>N. oleoabundans</i>)	0.033 ± 0.0006
EAV (<i>N. oleoabundans</i>)	0.120 ± 0.004
RA (<i>Chlorella</i> sp.)	0.029 ± 0.0020
RB (<i>Chlorella</i> sp.)	0.100 ± 0.0007

Cuantificación de Azúcares

8.3 Azúcares Totales

En cuanto al contenido de azúcares totales, se observa que el mayor contenido de carbohidratos se presentó en *Neochloris oleobundans* en el medio BBM con 66.29 mg/g, mientras que la misma microalga en el medio EAV presentó 24.40 mg/g. En el caso de *Chlorella sp.* los resultados obtenidos en BBM 3N/-N presentaron 46.78 mg/g de carbohidratos totales (Fig. 8). Estos resultados son similares a los reportados por (Salim et al. 2014), en donde evaluaron la cantidad de carbohidratos presentes en los EPS en *Chrorella vulgaris* (50 mg/g) y *Ettlia texensis* (35 mg/g).

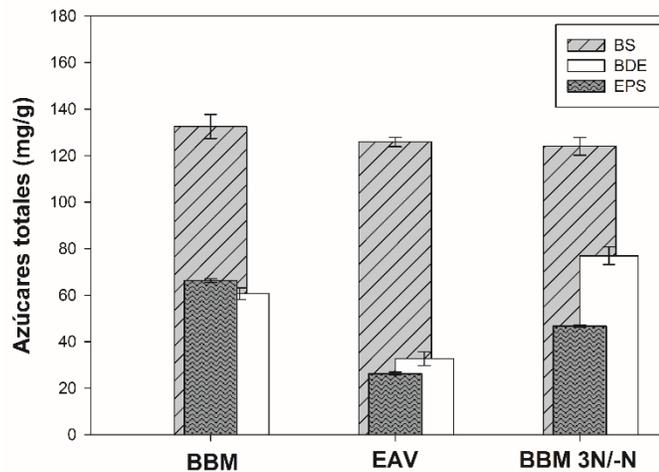


Fig. 8.- Azúcares totales de las diferentes muestras analizadas.

8.4 Azúcares Neutros

En cuanto a los análisis de azúcares neutros realizados se observaron valores en un rango de 25-30 mg/g en las muestras de EPS de las microalgas en los diferentes medios. Mientras que para BDE se observa que *Neochloris oleobundans* presenta valores similares de azúcares neutros en ambos medios; por otro lado, *Chlorella sp.* mostro la mayor cantidad de estos azúcares en el medio BBM 3N/-N (41.05 mg/g). En general se observó mayor cantidad en BDE que en el EPS extraído (Fig. 9).

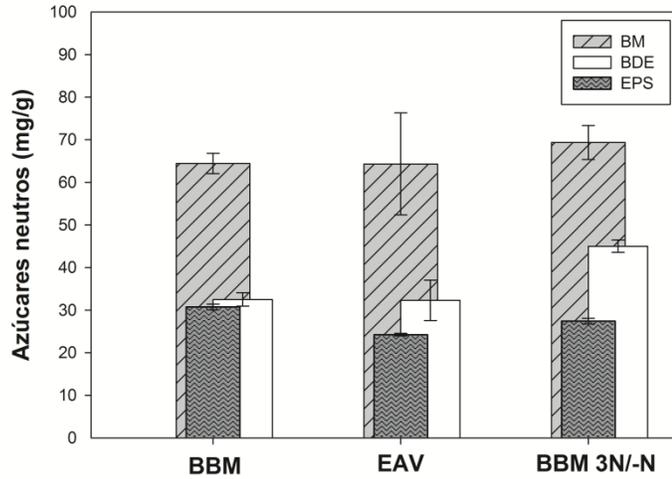


Figura 9.- Azúcares neutros de las diferentes muestras analizadas.

8.5 Ácidos Urónicos

En el análisis de ácido urónicos en *Neochloris oleobundands*, el medio EAV mostro la mayor cantidad para BS y EPS, seguido de BBM y finalmente de BBM 3N/-N. En cuanto a las muestras de BDE no se observó una diferencia en el contenido de ácido urónicos en las tres muestras analizadas (Fig 10).

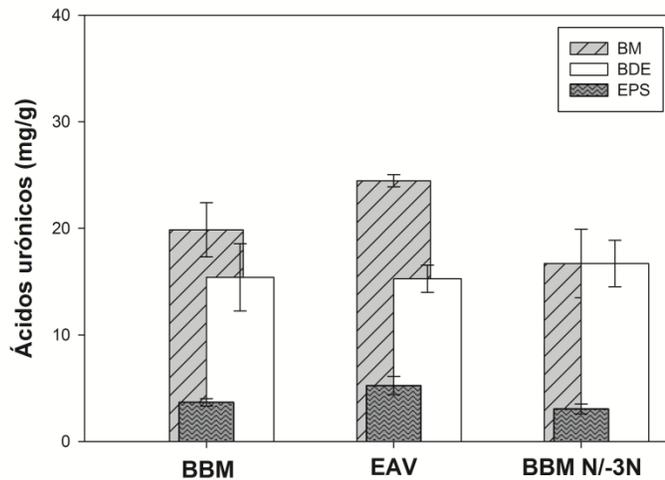


Figura 10. Ácidos urónicos de las diferentes muestras analizadas.

8.6 Cuantificación de proteína

En cuanto al contenido de proteína (tabla 8), se observó que en *Neochloris oleobunans* presentó el mayor contenido en medio BBM (2.56 mg/g), mientras que el menor contenido fue en *Chlorella sp.* (0.77 mg/g). El bajo contenido de proteína en las muestras analizadas corresponde con los estudios reportados por (Guo et al. 2013; Ohki et al. 2013). Salim estudio el posible rol de los EPS liberados y adheridos a las células de *Ettlia texensis* en los procesos de biofloculación, en estos EPS no encontró proteína en aquellos liberados al medio, mientras que en los adheridos a las células presentaron altas concentraciones de proteína (Salim et al. 2014).

Tabla 8. Contenido de proteína de EPS de microalgas proporcionadas por INECOL.

	Medio de cultivo		
	BBM	EAV	BBM 3N/-N
Microalga	<i>N. oleoabundans</i>	<i>N. oleoabundans</i>	<i>Chlorella sp.</i>
Proteína mg/g	2.56±0.049	3.02±0.026	0.77± 0.011

8.7 Análisis de FTIR

Para obtener una relación en la diferencia de los carbohidratos presentes en la biomasa de microalgas y verificar que estos resultados de EPS corresponden solo al compuesto extracelular extraído, se realizó la hidrólisis de la biomasa seca (BS) y la biomasa después de la extracción de EPS (BDE). En el análisis de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR), en las muestras de BS y EPS se observa la presencia de señales en la región de 900-1200 cm^{-1} que corresponde a los enlaces C-O-C, C-O, característicos de carbohidratos. Mientras que en la muestra de BDE se observa una disminución en esta región, confirmando la extracción de compuestos con este tipo de enlaces. Además, se observa la señal de 2900 cm^{-1} característica de los grupos CH_3 en la BS, mientras que en el BDE se observa una disminución en la señal. Por otro lado, en la región de 1640-1740

cm^{-1} se encuentra el grupo $\text{C}=\text{O}$ y en la región de $3000\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ los grupos $-\text{OH}$ ambos grupos encontrados en carbohidratos, estos resultados corresponden con espectros obtenidos para diferentes EPS en diferentes tipos de microalgas verdes (Shi et al. 2007; Mishra and Jha 2009; Díaz Bayona and Garcés 2014) (Fig 11).

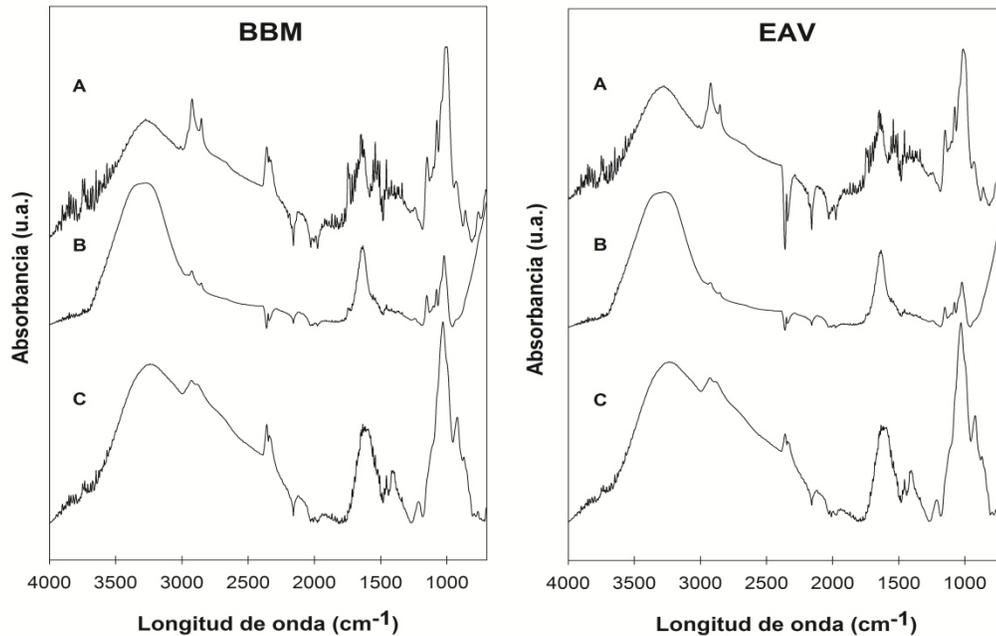


Figura 11.- Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier. de *Neochloris oleoabundans*
A) BS; B) BDE y C) EPS.

En la figura 12 perteneciente a la microalga *Chlorella* sp. se puede observar que en BDE no hay una disminución de las señales en la región $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ eso se podría deber a que en estas células el EPS generado por la microalga se encuentra adherido a la célula.

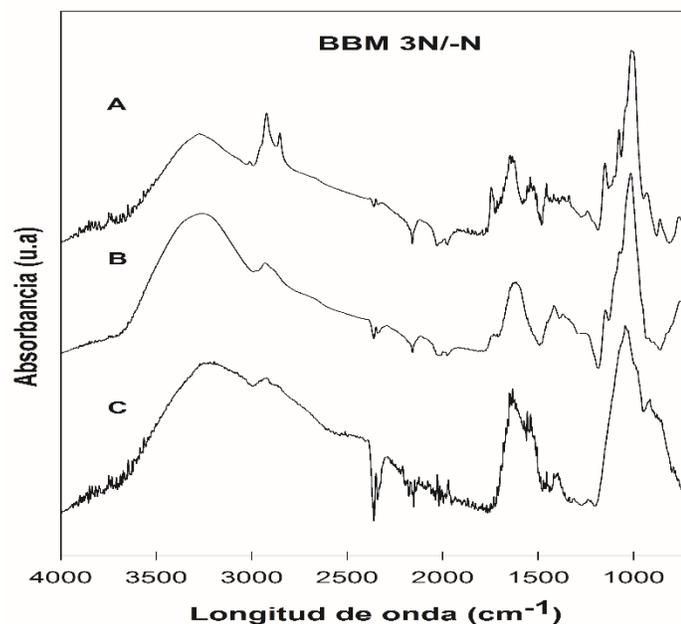


Figura 12.- Espectro de infrarrojo por transformadas de Fourier de *Chlorella* sp. A) BS; B) BDE y C) EPS.

8.8 Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS)

Los estándares de azúcares neutros analizados mediante cromatografía de gases acoplado a masas fueron: arabinosa, galactosa, glucosa, fucosa, manosa, xilosa y ramnosa. Como estándar interno fue utilizado el myo-inositol. Los azúcares fueron analizados de manera independiente. En la figura 13, se muestra el cromatograma donde se observa la separación de cada uno de los azúcares de acuerdo al método establecido. Estas condiciones establecidas, nos permitieron observar una buena separación de los azúcares analizados.

En cuanto a las muestras analizadas de los productos obtenidos de la extracción (EPS), el cromatograma es mostrado en la figura 14. En donde se observa la presencia de tres picos, los cuales de acuerdo al tiempo de retención corresponden a myo-inositol, galactosa y glucosa. Galactosa y Glucosa en las muestras de *N. oleobundans* en el medio BBV y EAV se encuentran presentes en relación 1:1.2, mientras que para *Chlorella* sp.

la relación es 1:1.5 en el medio BBM 3N/-N. En algunos estudios como el reportado por (Chi et al. 2007), se observa la presencia de un solo monosacárido en el EPS producido por una cianobacteria marina. En cuanto a la presencia de ácidos urónicos estos no fueron identificados mediante cromatografía de gases acoplado a masas, esto concuerda con lo reportado por De Philippis en donde sugiere que no hay una hidrólisis o degradación completa de los ácidos urónicos durante el proceso hidrólisis de EPS para la derivatización (De Philippis et al. 1998). A pesar de que existen algunos estudios sobre la producción de exopolisacáridos de microalgas verdes y su posible rol en el proceso de floculación, ningún análisis de caracterización sobre su composición monomérica es realizado (Salim et al. 2013; Díaz Bayona and Garcés 2014; Salim et al. 2014).

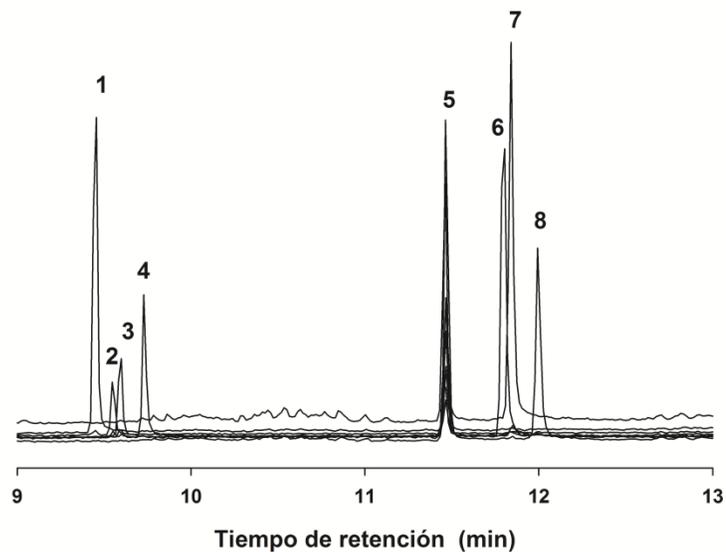


Figura 13.- Cromatograma de azúcares neutros analizados mediante cromatografía de gases acoplado a masas. 1) Ramnosa; 2) Fucosa; 3) Arabinosa; 4) Xilosa; 5) Myo Inositol; 6) Manosa; 7) Galactosa y 8) Glucosa.

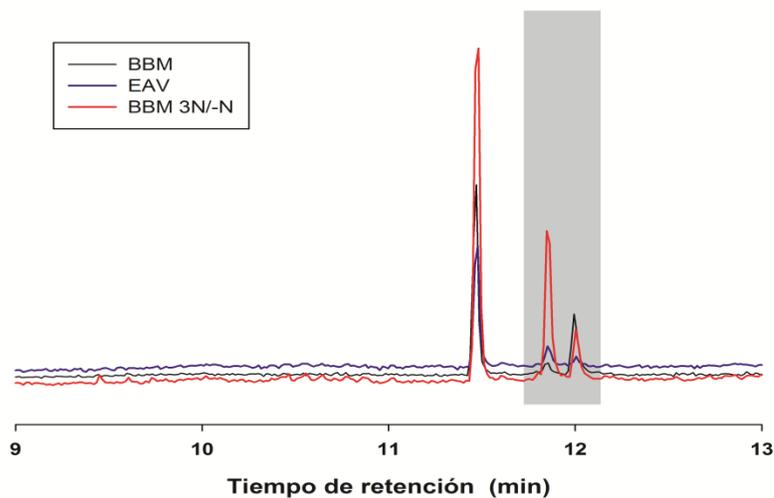


Figura 14.- Cromatograma de EPS extraídos de biomásas proporcionadas por INECOL.

Para nuestro conocimiento solo existe un estudio de *Neochloris oleoabundans* donde se encontró que esta microalga producía un EPS, sin embargo fue en un medio mixotrófico donde se adiciona lactosa como fuente de carbono, lamentablemente no se realizó ninguna caracterización posterior (Wu et al. 2011).

En un estudio reciente donde se investigó una cepa de *Chlorella vulgaris*, se utilizó un medio basal bold (BBM) con 3 veces la concentración de nitrógeno; resultando una producción de un agente floculante por esta cepa, en el análisis por CG/MS se observó en su composición monomérica glucosa, manosa y galactosa en una relación molar 5:5:2. Los autores indican que es el primer reporte de una *Chlorella* sp. productora de un agente floculante, siendo este un polisacárido adherido a las células (Alam et al. 2014).

Nuestros resultados muestran que la presencia de monómeros de glucosa y galactosa para una cepa de *Chlorella* en un medio con 3 veces la concentración habitual de nitrógeno en el medio basal bold (BBM), similar al estudio por Alam anteriormente mencionado, sin embargo esto fue en EPS liberado al medio, como se observó en los espectros de infrarrojo, existen carbohidratos los cuales no se desprendieron de la célula por lo que estos podrían estar adheridos a las células, de igual manera que en el estudio de Alam, estudios posteriores en esta cepa de *Chlorella* se podrían llevar a cabo para analizar estos posibles EPS adheridos a las células.

8.9 Determinación de crecimiento de biomasa por peso seco, pH, conductividad y consumo de nutrientes.

A lo largo del cultivo se observó un mayor crecimiento de biomasa en las microalgas en medio LC. El consorcio PT fue el que mayor productividad registro, con un rendimiento de peso seco a los 27 días de 3.1 g/L, mostrando aun potencial para seguir creciendo si el periodo de cultivo se extendía. De los consorcios cultivados en medio LC, el consorcio 01A fue el que tuvo menor rendimiento, sin embargo, se encuentra junto con el consorcio 12A cultivado en medio BBM que tiene mayor rendimiento 1.2 g/L y 1.1 g/L respectivamente (figura 15). Los rendimientos habituales de productividad de las microalgas varían entre 0.7 a 1-1.5 g/L, valores de crecimiento superiores a 1.5 g/L serian de interés para el sector industrial, se observa que los consorcios tuvieron una mejor tasa de crecimiento en el medio LC. El alto contenido de N en el medio LC podría ser uno de los factores que influyen en un mayor crecimiento de biomasa de los consorcios, varios estudios correlacionan esta condición de N con una mayor tasa de crecimiento en comparación con medios de baja concentración de N ((Banerjee et al. 2002; Yeesang and Cheirsilp 2011; Díaz Bayona and Garcés 2014), la alta concentración de N promueve un incremento de fotosíntesis que se enfoca en la producción de biomasa y una menor producción de compuestos como lípidos, carbohidratos y EPS (Zhila et al. 2005); esto presenta una situación en la que se ha propuesto sistemas de crecimiento en dos etapas; la primera en la que exista una suficiente cantidad de nutrientes para un rápido crecimiento y maximizar la cantidad de biomasa producida, seguida de una etapa en la que el contenido de lípidos sea incrementado por un ambiente escaso o falta de nutrientes, se observó en la microalga *Botryococcus braunii* que una baja concentración de N incrementa lípidos como triacilgliceroles, además de sufrir cambios en la composición de ácidos grasos totales (AG), al ser cultivada en un medio con un 75% menos N provoco que la concentración de lípidos incrementara 21% en comparación con las células cultivadas en el mismo medio con la concentración inicial normal de N (Zhila et al. 2005). Las microalgas son una fuente prometedor de nutrientes, además de proveer productos de valor agregado como ácidos grasos, pigmentos y antioxidantes. Uno de los sectores que se verá más beneficiado en un futuro por las tecnologías de

producción de microalgas es el de nutrición, además de los sectores energético, farmacéutico y cosmético (Pulz and Gross 2004).

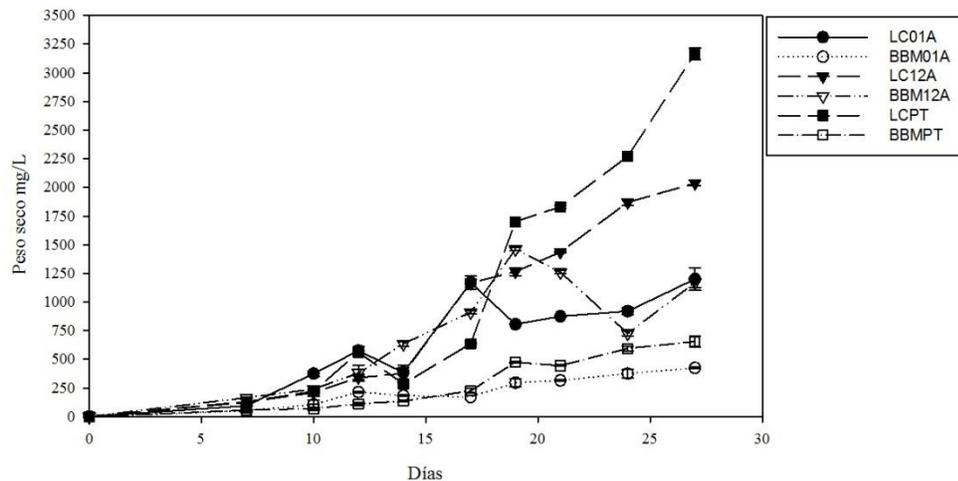


Fig. 15.- Productividad de biomasa de los consorcios en los distintos medios.

Entre las ventajas de usar luces LED como fuente de luz están: proporciona un consumo bajo de energía, genera poco calor, tienen larga expectativa de vida, toleran una mayor cantidad de intercambios encendido-apagado, mayor estabilidad y un bajo costo de construcción. Se ha encontrado que el uso de luz LED azul y roja emiten alrededor de 450-470 nm y 645-665 nm respectivamente (Yeh and Chung 2009), siendo la luz roja en la que se obtuvo un rendimiento mayor de crecimiento así como de producción de biomasa en un cultivo de *Spirulina platensis* (Wang et al. 2007); sin embargo, se ha reportado que el óptimo de longitud de onda varía entre las especies. La mayoría de los cultivos en fotobiorreactores utilizan lámparas fluorescentes las cuales generan consumos altos de energía y costos de operación, el reemplazar estas lámparas con LED resulta en un ahorro del 50% en el consumo de energía (de 40.32 a 20.16 kWh) (Chen et al. 2011).

Nutrientes

El N es un nutriente crítico requerido en el crecimiento de todos los organismos vivos. El nitrógeno orgánico se deriva de fuentes inorgánicas como nitratos (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), ácido nítrico (HNO_3), amonio (NH_4^+), amoniaco (NH_3) y nitrógeno gas (N_2). Se observó que el consumo de NH_4^+ comenzó primero que el de NO_3^- , ya que para las microalgas es más fácil asimilar el N en forma de amonio que en nitrato, debido a que no se necesita una reacción de reducción, por lo que gasta menor energía, como se muestra en la figura 16; sin embargo, aunque las microalgas prefieren el N en forma de amonio, el nitrato es la forma más termodinámicamente estable en medio acuático. En contraste un exceso de amonio podría tener efectos represivos (Cai et al. 2013); el medio BBM contiene una sexta parte de N en comparación con el medio LC el cual comienza en los 246 mg/L, incluso a los 27 días que se termina el experimento sigue estando disponible en el medio nitrato en el medio LC por lo que el cultivo podría extenderse probablemente otros 10-14 días (fig. 17).

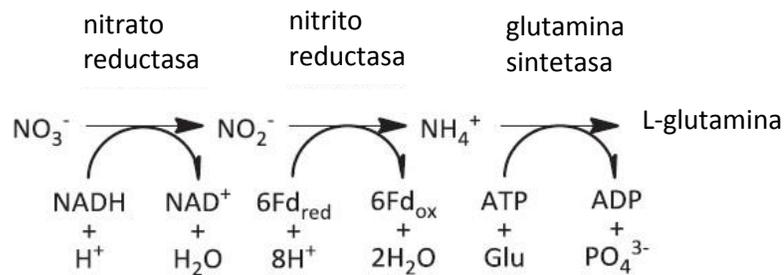


Fig. 16.- Esquema simplificado de la asimilación de nitrógeno inorgánico.

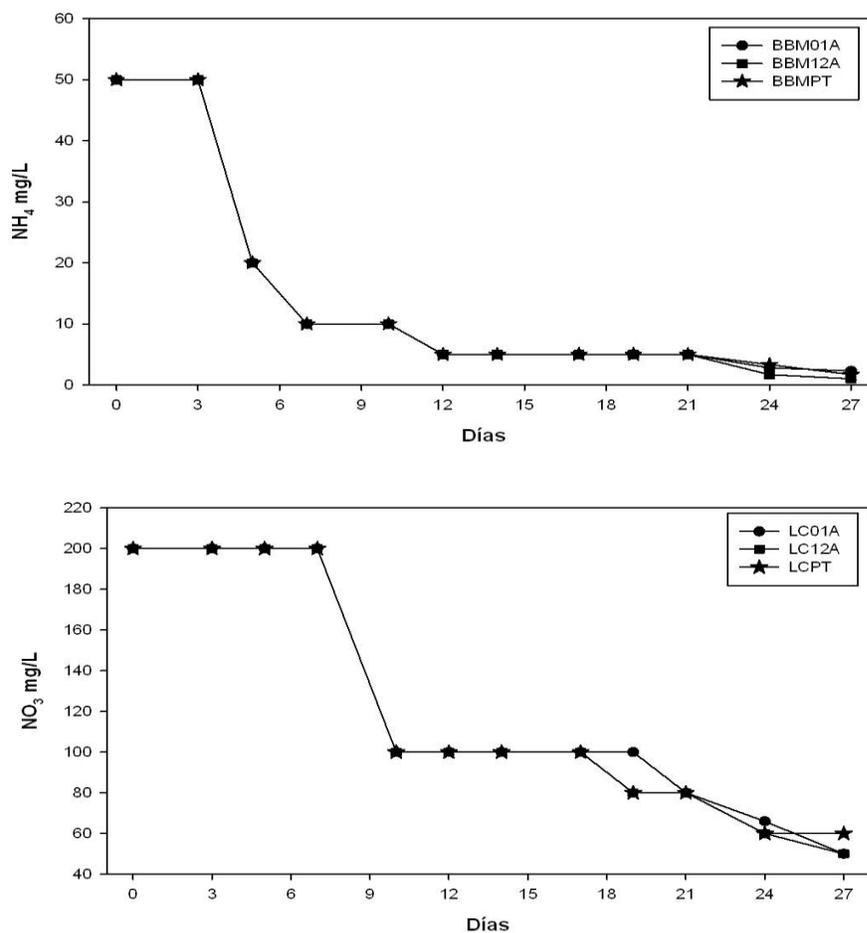


Fig. 17.- Consumo de N por los consorcios de microalgas en los diferentes medios.

El fósforo es otro de los nutrientes principales en el metabolismo de las microalgas, es encontrado en ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e intermediarios en el metabolismo de carbohidratos. Los consorcios se portaron de manera similar en el consumo de P, siendo el consorcio 01A en el medio LC el que mayor consumo de P presentó, a partir del quinto día se presenta una caída en la concentración de P de los medios, quedando aproximadamente hasta los días 15-17 en esta concentración y presentar un consumo total en el medio LC a los 27 días. En el medio BBM aun después de 27 días había P disponible (fig. 18).

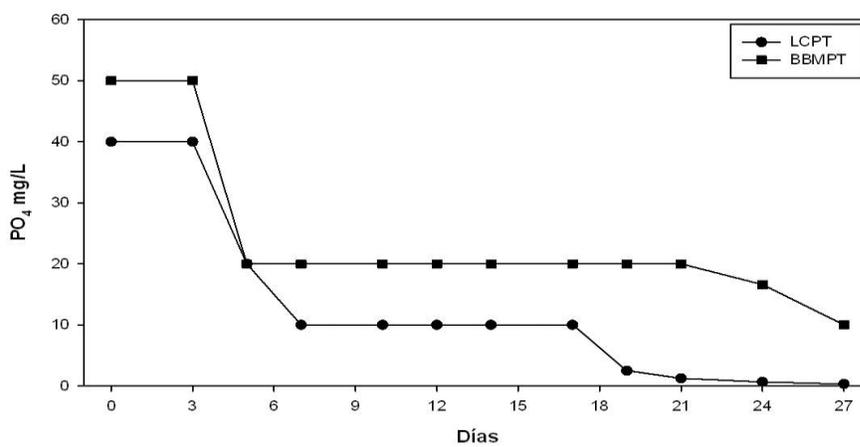
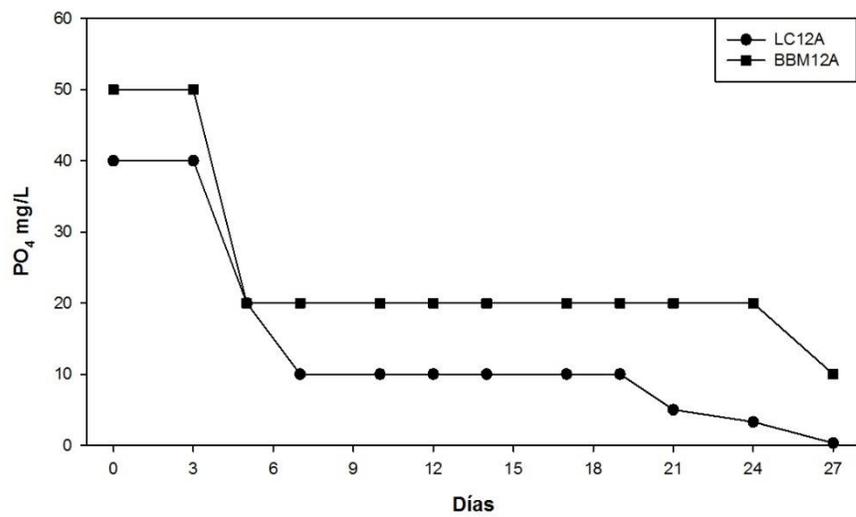
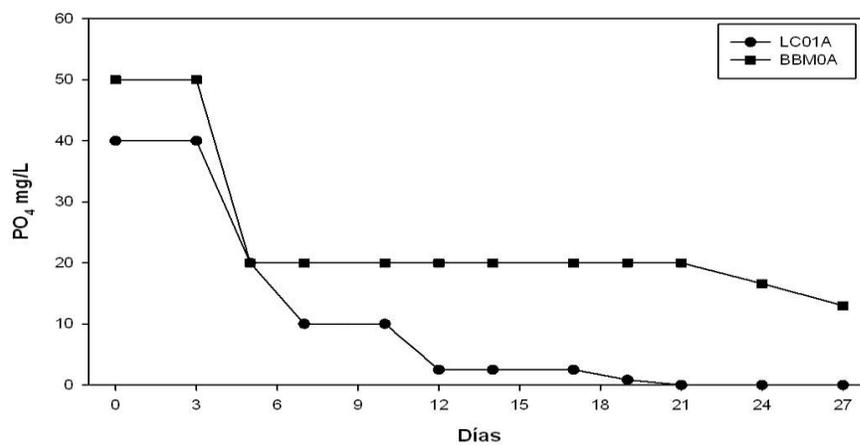


Fig. 18.- Consumo de P por los consorcios de microalgas en los diferentes medios.

8.10 pH y conductividad

Los valores de pH iniciales fueron 6.1 para medio BBM modificado y para medio LC entre 5.4, 5.8 y 6.1, el valor más bajo se debió a una precipitación de sales en una solución de preparación del medio, esto ocasiono un valor abajo del promedio (5.8). Se observa en la figura xx que los medios tuvieron un comportamiento similar, cada uno un diferente rango de pH, pero con características similares a lo largo del cultivo. Ambos medios al tercer día muestran un incremento de pH, esto se debe a la absorción de nitrógeno por las microalgas; aquellas cultivadas en NO_3 , este se reduce a NH_3 produciendo un ion OH^- . De acuerdo a la FAO los valores de pH para el cultivo de microalgas son de 7-9 y el óptimo se encuentra entre 8.2 y 8.7 (FAO 2014); sin embargo, estos podrían variar entre especies, además, al utilizar NH_4^+ se debe cuidar que el pH no se eleve de 8 ya que se propiciaría la formación de amoniaco el cual es letal para las células. En el caso de los consorcios, a pesar de que el medio LC no supero el valor de 7 en pH tuvo mayor productividad y crecimiento de biomasa que cuando fueron cultivados en medio BBM el cual alcanzo un pH de 7.9 (figura 19). Breuer reporta como 7 el valor óptimo de pH para una cepa de *Scenedesmus obliquus* este valor registro el mayor crecimiento así como la mayor acumulación de triacilglicerolos (TAG)(Breuer et al. 2013).

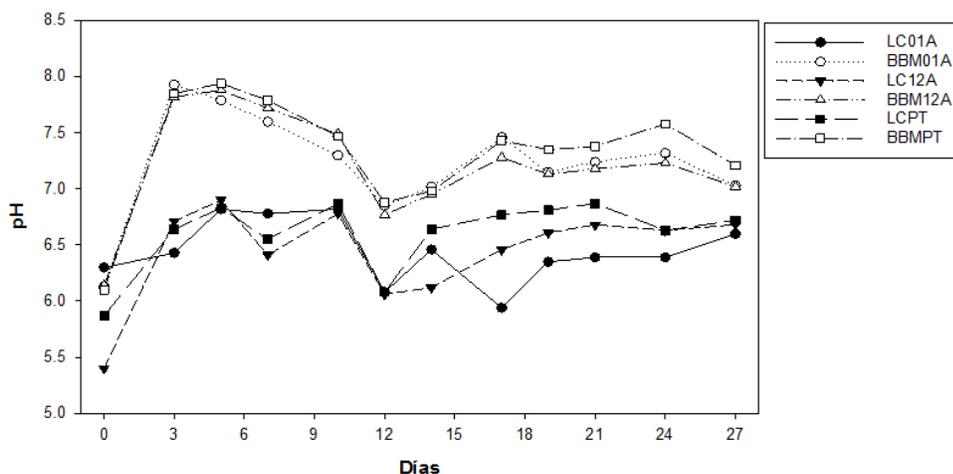


Fig. 19.- Valores de pH a lo largo del cultivo de los consorcios de microalgas.

La conductividad se mantuvo constante en la mayoría de los biorreactores, solo en el día 7 en el BBM el consorcio PT registra cerca de 0, posible error al momento de tomar la muestra. El medio BBM a lo largo del cultivo fue bajando gradualmente, a diferencia de los cultivos en medio LC que se mantuvieron constantes los valores a lo largo del experimento (figura 20). Una observación interesante es que la concentración de sales es mayor en el medio LC como se puede observar en la gráfica, sin embargo, su pH fue menor desde un inicio hasta el final del tiempo de experimentación. Esta alta concentración de sales podría estar vinculada en los resultados de eficiencia de floculación.

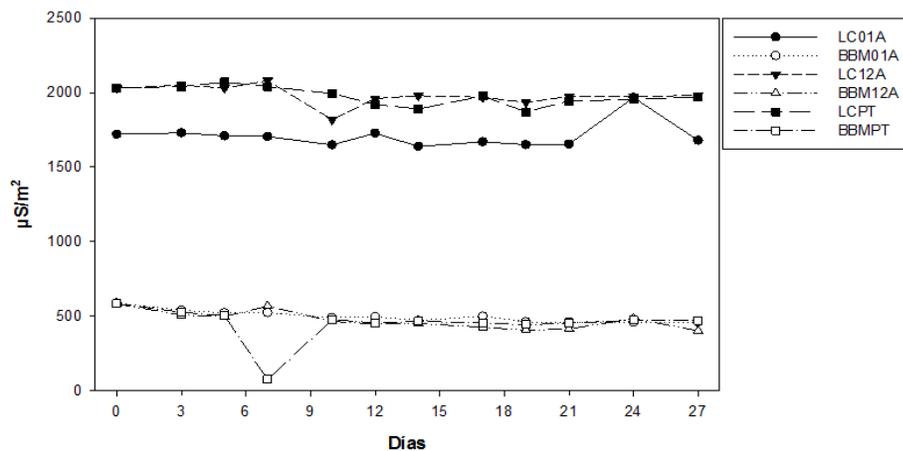


Fig. 20.- Conductividad de los distintos medios a lo largo del cultivo de consorcios.

8.11 Eficiencia de floculación

Se obtuvo una mayor eficiencia de floculación en los consorcios cultivados en medio LC, se observó que mientras transcurría el tiempo de cultivo fue aumentando la eficiencia de floculación (figura 21), una probable causa sería el número de células, haciendo más fácil la aglomeración celular y la formación de flóculos, además de la alta cantidad de sales Ca^+ y Mg^+ contenidas en el medio LC; las cuales en diversos estudios se han propuesto como inductores de la floculación ya que ayudan a neutralizar las

cargas negativas de la superficie celular (Vandamme et al. 2012; Wu et al. 2012; Wang et al. 2014).

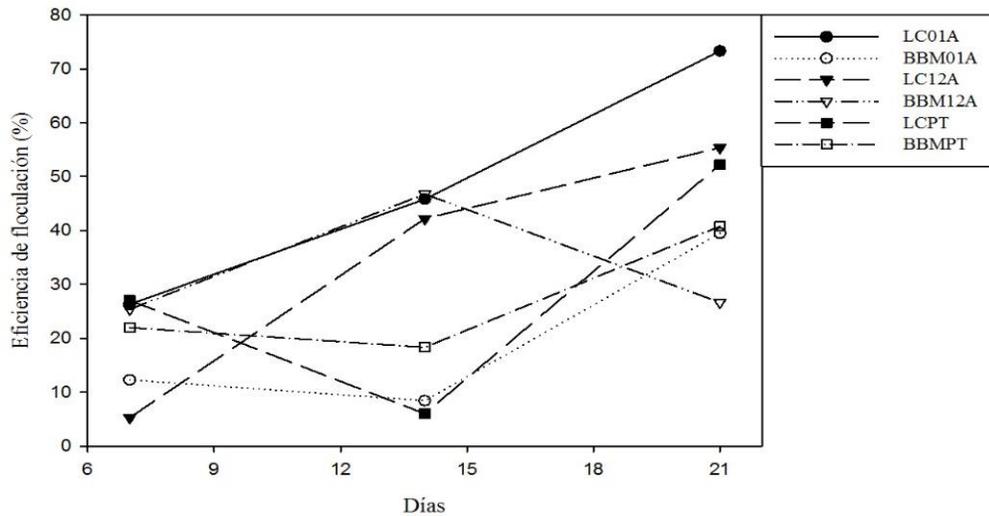


Fig. 21.- Eficiencia de floculación conforme paso del tiempo de los cultivos en distintos medios.

Los mejores resultados se obtuvieron a los 21 días de cultivo; siendo el consorcio 01A el que mayor eficiencia tuvo (73%), seguido de 12A (55%) y PT (52%) respectivamente, de igual manera el consorcio 01A también registro una mayor floculación en el medio BBM la mayor eficiencia la tuvo el consorcio PT 40.7% seguido del consorcio 01A con 39.4%, (fig. 22). El obtener resultados superiores de 60% en floculación sin la necesidad de agregar un agente químico que pudiera contaminar el medio para poder ser reutilizado es muy importante al hablar de cultivos a gran escala, la mayoría de las industrias que realizan cultivos de microalgas utilizan algún tipo de agente floculante que termina contaminando el medio haciéndolo imposible de reutilizar, como sulfatos de aluminio, sulfatos de hierro, poliacrilamida, entre otros (Chen et al. 2013; Sirin et al. 2013). El proceso de autofloculación de microalgas no requiere un costo extra en el cultivo de otros microorganismos o la purificación de un biofloculante para obtener la biomasa deseada a un precio rentable, es un método prometedor de bajo costo. Hasta la fecha solo algunas microalgas naturalmente autofloculantes han sido reportadas, las cuales aparentemente no satisfacen las necesidades para aplicaciones comerciales (Wan

et al. 2015). Estas condiciones varían entre los diferentes géneros de microalgas, incluso entre las mismas especies, dependiendo su ubicación geográfica y a las condiciones de crecimiento a las que estén habituadas, por ejemplo, una cepa de *Scenedesmus obliquus* aumento un 20% su eficiencia de floculación al añadir 25 mM de sales como Al^{3+} y Fe^3 , no observando un efecto significativo al usar sales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ (Guo et al. 2013). La floculación espontánea de *Chlorella vulgaris* JSC-7 fue investigada, y se caracterizó el agente floculante de esta microalga; fue comparada con otras microalgas que no presentaban el fenómeno de autofloculación, (*Chlorella vulgaris* CNW11 y *Scenedesmus obliquus* FSP) la cepa JSC-7 exhibió una mayor eficiencia de floculación con un 76%. Al momento de añadir la cepa floculante a los cultivos de las microalgas no floculantes *C. vulgaris* CNW11 y *S. obliquus* FSP ésta facilitó la floculación aumentando sus eficiencias en 68.3% y 62.7% respectivamente de un 25.6% y 28.1% observado en los cultivos originales de estas cepas no autofloculantes. Una característica interesante es que este fenómeno para la cepa JSC-7 no es dependiente de pH como se ha reportado en varias publicaciones, el primer reporte sobre un agente floculante producido por una *Chlorella* sp. autofloculante (Alam et al. 2014).

Una de las formas para concentrar la biomasa es aumentar el pH e inducir la formación de los flóculos celulares, causando la precipitación de partículas de hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, fosfato de calcio y otras partículas insolubles que cubren las superficies celulares neutralizando las cargas promoviendo la agregación celular. Sin embargo el incrementar el pH podría causar cambios en la composición celular (Salim et al. 2011). En el medio LC además de tener esta mayor eficiencia de floculación, no presento precipitados de sales, a pesar de tener concentraciones mayores que el medio BBM.

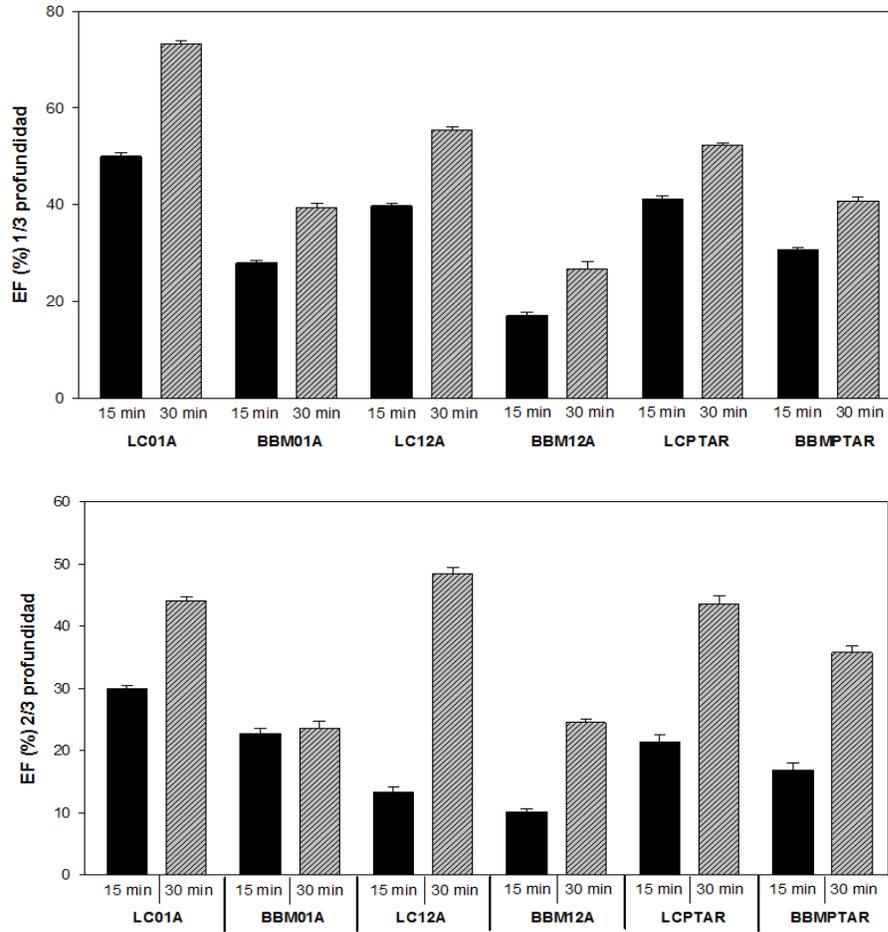


Fig. 22.- Eficiencia de floculación de los consorcios a los 21 días de cultivo.

En la figura 23, se observa la eficiencia de floculación del consorcio 01A en ambos medios a lo largo del ensayo.

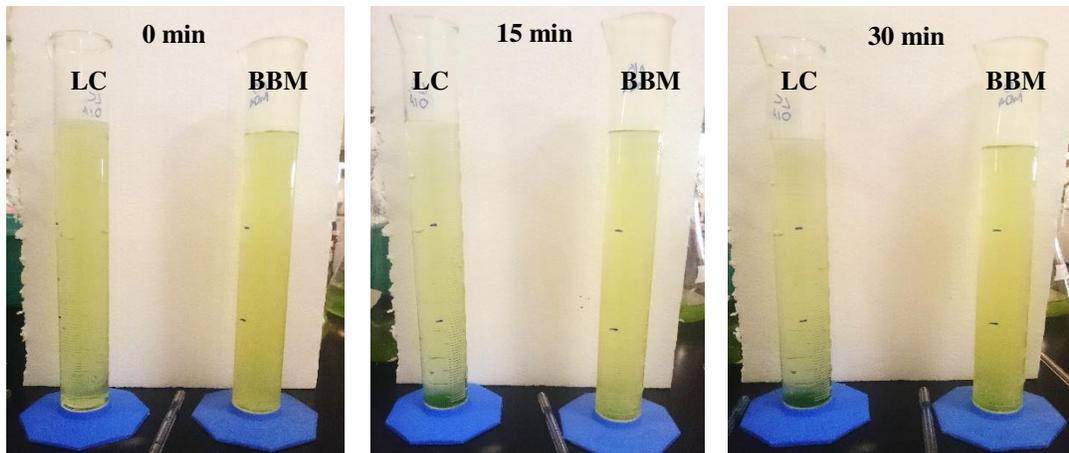


Fig. 23.- Eficiencia de floculación del consorcio 01A a los 21 días de cultivo.

8.12 Rendimiento y caracterización de EPS

En el rendimiento de EPS extraído se observa una mayor cantidad de compuesto extracelular obtenido en los consorcios en medio LC (tabla), sin embargo, estas cantidades son bajas en comparación con reportes de rendimiento de EPS (Chi et al. 2007; Mishra and Jha 2009; Díaz Bayona and Garcés 2014), esto se podría atribuir a que a lo largo del cultivo no hubo escases de nutrientes, además de estar en un ambiente en un pH y temperatura no estresantes, por lo que no requieren activar rutas metabólicas necesarias para reserva o protección celular. Para la cuantificación de carbohidratos, se analizaron los hidrolizados de la biomasa seca y la biomasa que queda después de la extracción de EPS; las cuantificaciones no arrojaron valores al realizar los ensayos por lo que la cantidad de carbohidratos presentes en los compuestos extracelulares fue muy escasa.

Tabla 9.- Rendimiento de EPS de los consorcios de microalgas en distintos medios.

	Medio de Cultivo					
	LC	BBM	LC	BBM	LC	BBM
Consorcio	01A	01A	12A	12A	PT	PT
EPS g/L	0.063±0.007	0.024±0.004	0.071±0.01	0.017±0.008	0.062±0.004	0.028±0.006

No se encontraron proteínas en los consorcios cultivados en ambos medios, esto se podría deber a la intensidad de luz y de nuevo el fotoperiodo 24/0, se observó que una cepa de *Scenedesmus* sp. cultivada en diferentes intensidades de luz, tuvo una correlación negativa en cuanto a la intensidad de luz y el contenido de proteínas, al día cuatro el porcentaje de proteína había bajado al 6.1% en la intensidad mayor (Liu et al. 2012).

8.13 Análisis de EPS por FTIR y cromatografía de gases GC/MS

El análisis de FTIR de la biomasa seca, la biomasa obtenida después de la extracción y el EPS obtenido mostro señales en la región 900-1200 cm^{-1} correspondientes a los grupos C-O-C, un pico de absorción en la región 1640-1740 cm^{-1} perteneciente a los grupos C=O, así como señales características del grupo OH⁻ en la región 3300-3400 cm^{-1} . Se puede observar que el pico en la región 900-1200 cm^{-1} de los grupos éter que sirven como unión entre monómeros de carbohidratos está presente en la biomasa seca (A); desaparece en la biomasa después de la extracción en las microalgas cultivadas en el medio BBM, pero no en medio LC (B) y nuevamente vuelve a aparecer en el compuesto extracelular obtenido (C) en ambos medios (fig. 24). Una observación interesante es que el precipitado del consorcio 01A del medio LC que presenta señales de grupo éter tuvo una consistencia viscosa, formando un gel el cual se piensa está compuesto de EPS ligados a la célula; es decir, los EPS producidos por este consorcio no son liberados totalmente al medio, esta condición solo se presenta en el medio LC probablemente debido a la concentración mayor de sales en el medio utilice estos EPS como una capa protectora de las células ante desecación, sin embargo, al no ser un pH elevado probablemente la cantidad necesaria es mínima y por eso los rendimientos de EPS obtenidos son bajos, otra posible respuesta es el fotoperiodo al que fueron sometidos los consorcios siendo 24/0 la célula no conto con un fotoperiodo de oscuridad.

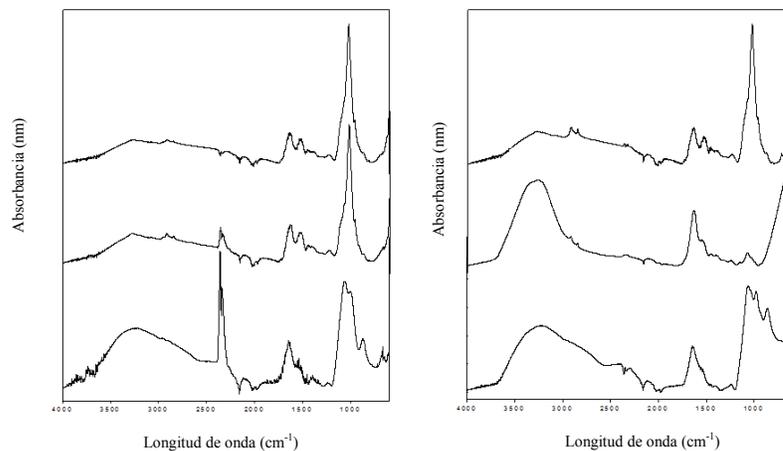


Fig. 24.- Espectro de IR del consorcio 01A A) Biomasa seca; B) Biomasa después de extracción de EPS; C) EPS.

En el análisis de cromatografía de gases CG/MS no se detectó presencia de carbohidratos en los EPS recuperados, el cromatograma solo mostraba el pico de myoinositol utilizado como estándar interno; de acuerdo con lo observado en los espectros de IR y la caracterización de carbohidratos, los resultados nulos obtenidos en CG/MS confirman que la floculación de los consorcios no se debe a una producción de EPS liberados al medio, y que en el medio LC el consorcio 01A tiene EPS ligados a la célula.

9. CONCLUSIONES

Se recuperaron compuestos extracelulares de las microalgas *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella* sp. cultivadas en medios que varían en composición de nitrógeno, así como de iones en forma de sales, lo cual proporciona condiciones ambientales diferentes. Para *N. oleoabundans*, una microalga caracterizada por su alto contenido de lípidos, aunque se presentó mayor cantidad de EPS en el medio a base de vinazas en relación al medio basal, la cantidad de EPS obtenido y las características del mismo sugieren que la floculación obtenida en ensayos previos podría estar más relacionada a otros factores, tales como altas concentraciones de iones de sales como Ca^+ y Mg^+ presentes en el medio EAV. Por otro lado, en el medio BBM 3N/-N, un medio basal modificado en cuanto a la presencia de nitrógeno, *Chlorella* sp. produjo 20% menos EPS que *N. oleoabundans*. Considerar la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) por parte de estas microalgas de interés en el área de bioenergéticos por ser altamente productoras de lípidos, deberá estudiarse de forma más extensa ya que los rendimientos de estos EPS son bajos para que el evento de autofloculación ocurra de forma natural y ayude en la etapa de recuperación de biomasa en el proceso de producción de biodiesel particularmente.

Se obtuvo una mayor producción de biomasa en los cultivos LC, el medio influyo en la eficiencia de floculación de los consorcios cultivados, aumentando a lo largo del tiempo de cultivo, habiendo mayor eficiencia en los consorcios cultivados en medio LC. En la cuantificación de azúcares se obtuvieron cantidades muy bajas, incluso no detectables por lo que se considera una baja producción de EPS por parte de los consorcios en ambos medios. De igual manera no se encontraron monómeros de carbohidratos en el ensayo de cromatografía de gases CG/MS. Se propone que la floculación de los consorcios en medio LC se deba a la composición del medio y a la alta concentración de sales; especialmente Ca^+ y Mg^+ y a la adaptabilidad de las microalgas para crecer en este medio.

10.PERSPECTIVAS

La microalga *Neochloris oleoabundans* por su capacidad de producir una gran cantidad de lípidos y su uso potencial en la industria bioenergética debe ser más analizada en relación a su efectividad de floculación, de acuerdo a nuestros resultados y al no haber una cantidad suficiente de EPS liberado se deberán hacer estudios sobre su comportamiento de floculación ante diferentes agentes floculantes.

También se deberán evaluar diferentes concentraciones de vinazas para conocer el comportamiento de la cepa.

La cepa de *Chlorella* sp. podría también ser utilizada para estudios de eficiencia de floculación y una posible producción de EPS adheridos a la célula.

Un estudio interesante sería realizar cultivos mixtos para tratar de llevar a cabo un proceso de biofloculación, utilizando una cepa que también tenga potencial en la industria de los bioenergéticos.

Para el consorcio con mayor eficiencia de floculación sería interesante hacer la caracterización de las microalgas que lo conforman, así como diversos estudios sobre el comportamiento de este en distintas condiciones de luz y fotoperiodos.

Realizar también una caracterización del perfil de lípidos o de compuestos de valor agregado que pudieran ser producidos por el consorcio 01A.

11.RESUMEN BIOGRAFICO

Julian Alberto Jesús Zaragoza Carmona

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con orientación en Biotecnología

Tesis: CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CARBOHIDRATOS EN EXOPOLISACÁRIDO DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS* Y *CHLORELLA* SP. MICROALGAS UTILES PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Campo de Estudio: Ciencias

Datos Personales: Nacido en Cd. Juárez Chihuahua el 16 de diciembre de 1982, hijo de María de Jesús Carmona y Cesar Zaragoza López.

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, grado obtenido Licenciatura en Química.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León grado obtenido Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología.

Experiencia Profesional:

Químico Laboratorista en el Hospital General de Cd. Juárez de Agosto 2006 – Diciembre 2008.

Investigador no docente del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas Septiembre 2016 – a la fecha.

12.BIBLIOGRAFIA

- Alam MA, Wan C, Guo SL, Zhao XQ, Huang ZY, Yang YL, Chang JS, Bai FW. 2014. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *J Biosci Bioeng* **118**: 29-33.
- Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* **5**: 340-345.
- Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. 2002. Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical reviews in biotechnology* **22**: 245-279.
- Beach ES, Eckelman MJ, Cui Z, Brentner L, Zimmerman JB. 2012. Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae *Neochloris oleoabundans*. *Bioresource Technology* **121**: 445-449.
- Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* **4**: 330-334.
- Boonchai R, Kaewsuk J, Seo G. 2015. Effect of nutrient starvation on nutrient uptake and extracellular polymeric substance for microalgae cultivation and separation. *Desalination and Water Treatment* **55**: 360-367.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH. 2013. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol* **143**: 1-9.
- Cai T, Park SY, Li Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **19**: 360-369.
- Chaiklahan R, Chirasuwan N, Triratana P, Loha V, Tia S, Bunnag B. 2013. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *International Journal of Biological Macromolecules* **58**: 73-78.
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour Technol* **102**: 71-81.
- Chen L, Wang C, Wang W, Wei J. 2013. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology* **133**: 9-15.
- Chi Z, Su CD, Lu WD. 2007. A new exopolysaccharide produced by marine Cyanothecce sp. 113. *Bioresour Technol* **98**: 1329-1332.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* **25**: 294-306.
- Daroch M, Geng S, Wang G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy* **102**: 1371-1381.
- De Philippis R, Margheri MC, Materassi R, Vincenzini M. 1998. Potential of Unicellular Cyanobacteria from Saline Environments as Exopolysaccharide Producers. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1130-1132.
- De Philippis R, Sili C, Paperi R, Vincenzini M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology* **13**: 293-299.
- Deng S, Yu G, Ting YP. 2005. Production of a bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal. *Colloids Surf B Biointerfaces* **44**: 179-186.
- Díaz Bayona KC, Garcés LA. 2014. Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* **26**: 2087-2095.
- Ding Z, Jia S, Han P, Yuan N, Tan N. 2012. Effects of carbon sources on growth and extracellular polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* under heterotrophic high-cell-density fed-batch cultures. *Journal of Applied Phycology* **25**: 1017-1021.
- Duan J, Gregory J. 2003. Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science* **100-102**: 475-502.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.
- Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC et al. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* **478**: 337-342.
- Food and agriculture organization of United Nations.
<http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e06.htm#2.3.%20Algal%20production> Accesada en Junio 2016
- Gao Y, Gregor C, Liang Y, Tang D, Tweed C. 2012. Algae biodiesel - a feasibility report. *Chemistry Central Journal* **6**: S1-S1.

- Gomez-Casati DF, Cortassa S, Aon MA, Iglesias AA. 2003. Ultrasensitive behavior in the synthesis of storage polysaccharides in cyanobacteria. *Planta* **216**: 969-975.
- González-Fernández C, Ballesteros M. 2012. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *Journal of Applied Phycology* **25**: 991-999.
- Gouveia L, Marques AE, da Silva TL, Reis A. 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 821-826.
- Greenwell HC, Laurens LM, Shields RJ, Lovitt RW, Flynn KJ. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface* **7**: 703-726.
- Guo SL, Zhao XQ, Wan C, Huang ZY, Yang YL, Alam MA, Ho SH, Bai FW, Chang JS. 2013. Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest. *Bioresour Technol* **145**: 285-289.
- Kumar AS, Mody K, Jha B. 2007. Bacterial exopolysaccharides--a perception. *Journal of basic microbiology* **47**: 103-117.
- Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. 2008. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *Journal of Applied Phycology* **21**: 559-567.
- Lee SH, Lee SO, Jang KL, Lee TH. 1995. Microbial flocculant from *Arcuadendron* sp. TS-49. *Biotechnology Letters* **17**: 95-100.
- Liu J, Yuan C, Hu G, Li F. 2012. Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 2127-2137.
- Liu Y, Wang W, Zhang M, Xing P, Yang Z. 2010. PSII-efficiency, polysaccharide production, and phenotypic plasticity of *Scenedesmus obliquus* in response to changes in metabolic carbon flux. *Biochemical Systematics and Ecology* **38**: 292-299.
- Loera-Quezada MM, Olguín EJ. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* **1**: 91-116.
- Lupi FM, Fernandes HML, Tomé MM, Sá-Correia I, Novais JM. 1994. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme and Microbial Technology* **16**: 546-550.
- Markou G, Chatzipavlidis I, Georgakakis D. 2012. Carbohydrates Production and Bio-flocculation Characteristics in Cultures of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Improvements Through Phosphorus Limitation Process. *BioEnergy Research* **5**: 915-925.
- Milledge JJ, Heaven S. 2012. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **12**: 165-178.
- Mishra A, Jha B. 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliellasalina* under salt stress. *Bioresour Technol* **100**: 3382-3386.

- Molina Grima E, Belarbi EH, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* **20**: 491-515.
- Murray KE, Healy FG, McCord RS, Shields JA. 2011. Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open trough system. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**: 89-95.
- Ohki K, Le NQT, Yoshikawa S, Kanesaki Y, Okajima M, Kaneko T, Thi TH. 2013. Exopolysaccharide production by a unicellular freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated from a rice field in Vietnam. *Journal of Applied Phycology* **26**: 265-272.
- Olguin EJ. 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol Adv* **30**: 1031-1046.
- Olguín EJ, Dorantes E, Castillo OS, Hernández-Landa VJ. 2015. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. *Journal of Applied Phycology* **27**: 1813-1822.
- Pahl SL, Lee AK, Kalaitzidis T, Ashman PJ, Sathe S, Lewis DM. 2013. Harvesting, Thickening and Dewatering Microalgae Biomass. 165-185.
- Pruvost J, Van Vooren G, Cogne G, Legrand J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology* **100**: 5988-5995.
- Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 635-648.
- Rakesh S, Saxena S, Dhar DW, Prasanna R, Saxena AK. 2013. Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology* **26**: 399-406.
- Rossi F, De Philippis R. 2016. Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. in *The Physiology of Microalgae* (eds. AM Borowitzka, J Beardall, AJ Raven), pp. 565-590. Springer International Publishing, Cham.
- Salehizadeh H, Shojaosadati SA. 2001. Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances* **19**: 371-385.
- Salim S, Bosma R, Vermue MH, Wijffels RH. 2011. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J Appl Phycol* **23**: 849-855.
- Salim S, Kosterink NR, Tchetskoua Wacka ND, Vermuë MH, Wijffels RH. 2014. Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*. *Journal of Biotechnology* **174**: 34-38.
- Salim S, Shi Z, Vermue MH, Wijffels RH. 2013. Effect of growth phase on harvesting characteristics, autoflocculation and lipid content of *Ettlia texensis* for microalgal biodiesel production. *Bioresour Technol* **138**: 214-221.
- Salim S, Vermue MH, Wijffels RH. 2012. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. *Bioresour Technol* **118**: 49-55.
- Santos AM, Janssen M, Lamers PP, Evers WAC, Wijffels RH. 2012. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology* **104**: 593-599.

- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research* **1**: 20-43.
- Schlesinger A, Eisenstadt D, Bar-Gil A, Carmely H, Einbinder S, Gressel J. 2012. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnol Adv* **30**: 1023-1030.
- Shi Y, Sheng J, Yang F, Hu Q. 2007. Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry* **103**: 101-105.
- Singh S, Das S. 2011. Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 1971-1980.
- Sirin S, Clavero E, Salvado J. 2013. Potential pre-concentration methods for *Nannochloropsis gaditana* and a comparative study of pre-concentrated sample properties. *Bioresour Technol* **132**: 293-304.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* **101**: 87-96.
- Suh H-H, Kwon G-S, Lee C-H, Kim H-S, Oh H-M, Yoon B-D. 1997. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**: 108-112.
- Takeda H, Hirokawa T. 1978. Studies on the cell wall of *Chlorella* I. Quantitative changes in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant and Cell Physiology* **19**: 591-598.
- Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Forde GM, Hoadley A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* **2**: 012701.
- Vandamme D, Foubert I, Fraeye I, Meesschaert B, Muylaert K. 2012. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresour Technol* **105**: 114-119.
- Vandamme D, Foubert I, Meesschaert B, Muylaert K. 2009. Flocculation of microalgae using cationic starch. *Journal of Applied Phycology* **22**: 525-530.
- Wan C, Alam MA, Zhao XQ, Zhang XY, Guo SL, Ho SH, Chang JS, Bai FW. 2015. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresour Technol* **184**: 251-257.
- Wang C-Y, Fu C-C, Liu Y-C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* **37**: 21-25.
- Wang L, Lee D-J, Ma F, Wang A, Ren N. 2014. Bioflocculants from isolated strain or mixed culture: Role of phosphate salts and Ca²⁺ ions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **45**: 527-532.
- Wotton RS. 2004. Ubiquity and many role of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Scientia Marina* **68**: 13-21.
- Wu N, Li Y, Lan CQ. 2011. Production and Rheological Studies of Microalgal Extracellular Biopolymer from Lactose Using the Green Alga *Neochloris oleoabundans*. *Journal of Polymers and the Environment* **19**: 935-942.
- Wu Z, Zhu Y, Huang W, Zhang C, Li T, Zhang Y, Li A. 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresour Technol* **110**: 496-502.

- Yeesang C, Cheirsilp B. 2011. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology* **102**: 3034-3040.
- Yeh N, Chung J-P. 2009. High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **13**: 2175-2180.
- Zhila NO, Kalacheva GS, Volova TG. 2005. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *Journal of Applied Phycology* **17**: 309-315.
- Zouboulis AI, Xiao-Li C, Katsoyiannis IA. 2004. The application of biofloculant for the removal of humic acids from stabilized landfill leachates. *Journal of Environmental Management* **70**: 35-41.