

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR CEPAS NATIVAS DE *Chlorella pyrenoidosa* y  
*Rhodotorula mucilaginosa* Y GENERACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO

Por

GUSTAVO RAÚL REYNA MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Octubre, 2012

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la Facultad de Ciencias Químicas, en la Unidad Immunobiología y Acarreadores de Drogas de la Facultad de Ciencias Biológicas, y en el laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, todos estos en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorulla mucilaginosa* Y GENERACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO**

**Aprobado por  
Comité de Tesis**

---

Director de la tesis  
Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

---

Director Externo  
Dr. Isaías Balderas Rentería

---

Secretario  
Dra. Patricia Tamez Guerra

---

Vocal  
Dr. Edgar Mendoza Gamboa

---

Vocal  
Dr. Moisés Franco Molina

---

Vocal  
Dr. Pablo Zapata Benavides

## **DEDICATORIA**

**A mi madre, Ma. Guadalupe Martínez**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores Ricardo Alberto Gómez Flores e Isaías Balderas Rentería, asesores de mi tesis, así como a los doctores Patricia Tamez Guerra, Edgar Mendoza Gamboa, Moisés Franco Molina y Pablo Zapata Benavides, por formar parte del comité de tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

A los maestros y doctores Xristo Zarate, María del Rayo Camacho, Mirna Yeverino, Jesús Zaragoza, Martha Santoyo y Enriqueta Monreal por facilitarme los medios necesarios para la realización de los experimentos necesarios para la conclusión de mi tesis.

A todo el personal de los Laboratorios de Ingeniería Genética y Genómica, y de Inmunología y Acarreadores de Drogas, por compartir conmigo sus conocimientos y por el apoyo brindado durante mi estancia en ellos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A todos mis amigos y compañeros que fueron siempre un apoyo: Emanuel Córdova, Juan Ballesteros, Eder Arredondo, Olivia Flores, Francis Chávez, Cynthia Alvizo, Héctor Ramírez, Juan Favela, Aralia León, Humberto Hernández, Marcela Garza, Nora Mares, Magda Celina, Juan Favela, Sandra Cortinas y a todas esas personas que durante este periodo hicieron más placentera mi estancia por los laboratorios.

A mi familia por el apoyo que siempre me ha brindado, ya que sin ellos esta labor habría sido imposible.

A Abril Granados, quien a lo largo de este proyecto me acompañó y brindó su apoyo en todo momento

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>4</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>5. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
5.1 COMBUSTIBLES DERIVADOS DEL PETRÓLEO.....	5
5.2 BIOCOMBUSTIBLES.....	6
5.3 MICROORGANISMOS CON ALTA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS.....	12
5.3.1 Algas unicelulares.....	12
5.3.1.1. <i>Chlorella</i> .....	16
5.3.2. Levaduras.....	19
5.3.2.1. <i>Rhodotorula</i> .....	21
5.3.3 Consorcio y Sinergia Alga-Levadura.....	24
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
6.1 MATERIAL.....	26
6.1.1 Cepas.....	26
6.1.2 Mantenimiento de las Cepas.....	26
6.1.3 Reactivos.....	27
6.1.4 Equipo.....	28
6.2 MÉTODOS.....	29
6.2.1. Evaluación de la producción de biomasa, acumulación de lípidos y perfil de ácidos grasos para <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> de manera independiente, en sus condiciones idóneas.....	29
6.2.1.1 Curvas de crecimiento en medios de enriquecimiento.....	30

6.2.1.2	Curvas de Crecimiento en medios para producción de lípidos y determinación del tiempo de los experimentos.....	31
6.2.1.3.	Determinación de biomasa y lípidos para <i>R. mucilaginosa</i> y <i>C. pyrenoidosa</i> en sus medios de cultivo idóneos.....	33
6.2.2.	Diseño de las condiciones para un cultivo mixto en el que puedan desarrollarse ambas cepas.....	36
6.2.3.	Evaluación y comparación de la producción de biomasa y acumulación de lípidos en el medio mixto para ambas cepas de manera independiente y en conjunto.....	38
6.2.3.1	Evaluación de la producción de biomasa y acumulación de lípidos en el medio mixto para ambas cepas por separado.....	38
6.2.3.2	Evaluación de la producción de biomasa y acumulación de lípidos en el medio mixto para ambas cepas en conjunto.....	39
6.2.3.2.1	Curvas de crecimiento de ambas cepas en conjunto.....	39
6.2.3.2.2	Evaluación de la producción de biomasa y lípidos para ambas cepas en conjunto.....	40
6.2.4	Análisis y comparación de los ácidos grasos presentes en las cepas creciendo por separado y en conjunto.....	40
6.2.5	Análisis Estadístico.....	42
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
7.1	CURVAS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INOCULACIÓN.....	43
7.2	CURVAS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS PARA PRODUCCIÓN DE LIPIDOS Y DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE LOS EXPERIMENTOS.....	44

7.2.1	Curvas de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medios para producción de lípidos.....	44
7.2.2	Curvas de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medios para producción de lípidos.....	48
7.3	DISEÑO DE LAS CONDICIONES PARA UN CULTIVO MIXTO EN EL QUE PUEDAN DESARROLLARSE AMBAS CEPAS.....	51
7.3.1	Curvas de crecimiento para ambas cepas en medios mixtos creciendo de manera independiente.....	51
7.3.1.1	Medio Mixto 1.....	51
7.3.1.2	Medio Mixto 2.....	52
7.3.1.3	Medio Mixto 3.....	53
7.3.1.4	Medio Mixto 4.....	54
7.3.2	Curvas de crecimiento para ambas cepas en conjunto.....	55
7.3.2.1	Curvas de Crecimiento en Sinergia No. 1.....	55
7.3.2.2	Curvas de Crecimiento en Sinergia No. 2.....	56
7.3.2.3	Curvas de Crecimiento en Sinergia No. 3.....	56
7.4	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS CON <i>R. mucilaginosa</i> .....	57
7.5	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS CON <i>C. pyrenoidosa</i> .....	60
7.6	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCION DE BIOMASA Y LÍPIDOS CON AMBOS MICROORGANISMOS EN UN CULTIVO MIXTO.....	63
7.7	ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LAS CEPAS CRECIENDO DE MANERA INDEPENDIENTE Y EN CONJUNTO.....	65
7.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	69
	<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
	<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
	<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>76</b>
	<b>APÉNDICE A, LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>88</b>

<b>APÉNDICE B, PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y</b>	
<b>MEDIOS DE CULTIVO.....</b>	<b>90</b>
<b>RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO .....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I.- Comparación de emisiones promedio entre biodiesel y diesel derivado de petróleo.....	9
II.- Comparación en rendimiento de fuentes de biodiesel.....	11
III.- Contenido de lípidos de algunas especies de microalgas.....	14
IV.- Características de biodiesel producido a partir de algas y comparación con diesel de petróleo.....	15
V.- Distintas cepas de levaduras oleaginosas.....	20
VI.- Clasificación taxonómica de <i>R. mucilaginosa</i> .....	23
VII.- Producción de biomasa y lípidos con <i>R. mucilaginosa</i> .....	57
VIII.- Producción de biomasa y lípidos con <i>C. pyrenoidosa</i> .....	60
IX.- Producción de biomasa y lípidos por ambas cepas en un cultivo mixto.....	63
X.- Porcentajes de ácidos grasos en <i>R. mucilaginosa</i> .....	66
XI.- Porcentajes de ácidos grasos en <i>C. pyrenoidosa</i> .....	67

XII.- Porcentajes de ácidos grasos de ambas cepas creciendo en conjunto.....	68
XIII.- Prueba de Kolmogrov-Smirnov.....	69
XIV.- Prueba estadística de ANOVA.....	69
XV.- Comparación entre las medias por prueba de Scheffé.....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Diagrama general del proceso de fabricación de biodiesel.....	7
2.- Distintas cepas de algas oleaginosas.....	16
3.- Macromoléculas presentes en <i>C. protothecoides</i> en distintos medios de cultivo.....	18
4.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio de enriquecimiento.....	43
5.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio de enriquecimiento.....	44
6.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio MSM1.....	45
7.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio BN.....	46
8.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio NLM.....	46
9.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio FM.....	47

10.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio BN.....	48
11.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio BG11M.....	49
12.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio BM.....	49
13.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio MBM.....	50
14.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio mixto 1.....	51
15.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio mixto 1.....	52
16.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio mixto 2.....	52
17.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio mixto 2.....	53
18.- Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio mixto 3.....	53
19.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> en medio mixto 3.....	54

20.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> (4 mL de inóculo) y <i>R. mucilaginosa</i> (1 mL de inóculo).....	55
21.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> (4 mL de inóculo) y <i>R. mucilaginosa</i> (0.5 mL de inóculo).....	56
22.- Curva de crecimiento de <i>C. pyrenoidosa</i> (4 mL de inóculo) y <i>R. mucilaginosa</i> (1 mL de inóculo 24 horas después).....	56
23.- Producción de biomasa con <i>R. mucilaginosa</i> .....	58
24.- Producción de lípidos con <i>R. mucilaginosa</i> .....	58
25.- Porcentaje de lípidos en <i>R. mucilaginosa</i> .....	59
26.- Producción de biomasa con <i>C. pyrenoidosa</i> .....	61
27.- Producción de lípidos con <i>C. pyrenoidosa</i> .....	61
28.- Porcentaje de lípidos en <i>C. pyrenoidosa</i> .....	62
29.- Producción de biomasa con ambas cepas en dos distintas sinergias.....	63
30.- Producción de lípidos con ambas cepas en dos distintas sinergias.....	64
31.- Porcentaje de lípidos de ambas cepas en dos Distintas sinergias.....	64
32.- Cromatograma del análisis de ácidos grasos de	

<i>R. mucilaginosa</i> .....	66
33.- Cromatograma del análisis de ácidos grasos de <i>C. pyrenoidosa</i> .....	67
34.- Cromatograma del análisis de ácidos grasos de ambas cepas creciendo en conjunto.....	68

## RESUMEN

**QFB Gustavo Raúl Reyna Martínez**

**Fecha de Graduación: Octubre 2012**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

**Título de estudio:** PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR CEPAS NATIVAS DE *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* Y GENERACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO.

**Número de Páginas:** 95

**Propósito y Método de Estudio:** Actualmente el desarrollo tecnológico en el campo de energías alternativas ha cobrado relevancia dadas las desventajas que presentan los combustibles fósiles. Esto ha generado interés en la producción de biodiesel, el cual puede obtenerse a través de microorganismos oleaginosos. En el presente trabajo se evaluó la producción de lípidos por la microalga *Chlorella pyrenoidosa* y la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* con potencial en la fabricación de biodiesel por el método de Bligh y Dyer. El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases, a partir de cultivos independientes usando variantes de condiciones nutricionales. Posteriormente se determinó el efecto del consorcio sinérgico alga- levadura y la producción de lípidos, con el objetivo de mejorar el rendimiento de los mismos.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se logró comprobar que las cepas con las que se trabajaron en el presente estudio caben dentro de la clasificación de cepas oleaginosas ya que pueden acumular más del 20% de lípidos en relación a su biomasa seca. Se diseñó un medio de cultivo en el que ambas cepas pudieron desarrollarse correctamente y llevar a cabo una relación sinérgica en relación a su productividad de biomasa y lípidos. Se determinó a su vez que los lípidos presentes en ambas cepas tanto cuando crecen por separado como en conjunto, producen en su mayoría ácidos grasos que pueden ser utilizados como materia prima en la fabricación de biodiesel.

# 1. INTRODUCCIÓN

Se estima que en las siguientes décadas las fuentes de energía no renovables tales como el petróleo se agotarán, mientras que la demanda energética por parte de la población y las industrias seguirán en aumento. Aunado a esto, los combustibles fósiles derivados del petróleo generan gases nocivos para el medio ambiente principalmente óxidos de azufre ( $\text{SO}_x$ ) y monóxido de carbono (CO), en mayor proporción que otros combustibles; dichos gases junto al  $\text{CO}_2$  son causantes del efecto invernadero, por lo cual se busca reducir su uso (Patil *et al.*, 2008). Resultado de esto es que los gobiernos y las industrias se encuentren en búsqueda de nuevas fuentes de energía. El carbón y las fuentes de energía radioactiva se han propuesto como sustitutos del petróleo, pero estas fuentes de energía son limitadas, además de ser no renovables por lo que también se agotarán en algún momento (Campbell, 2008).

Por lo anterior es que en la actualidad se buscan fuentes de energía en forma de combustibles líquidos que sean renovables, económicas y menos nocivas para el medio ambiente que los combustibles fósiles. Una de estas alternativas es el uso de biocombustibles. Dentro de los biocombustibles se encuentra el biodiesel, cuya producción se basa en la transesterificación con metanol de triglicéridos de cadena larga procedentes de fuentes renovables, lo cual produce metil-ésteres de cadena larga que pueden ser utilizados como un combustible con menor producción de  $\text{SO}_x$  y CO. Sin embargo, este método de producción es entre un 70 y un 80% más costoso que el diesel común y afecta a los recursos y territorios utilizados por la industria alimenticia, por lo que se están explorando nuevas maneras de producir este combustible a un costo menor y utilizando materias primas que no presenten competencia contra la producción agrícola de alimentos (Li-Xia *et al.*, 2009).

Los estudios previos se han enfocado a encontrar nuevas fuentes y materias primas para la producción de biodiesel, lo cual ha llevado a la evaluación del uso de microorganismos capaces de acumular lípidos, los cuales posteriormente puedan ser transesterificados para la producción de metil-ésteres. Dentro de estos microorganismos, podemos encontrar a las algas unicelulares, que se consideran una fuente de gran

potencial debido a su corto ciclo de vida (24 h), alta acumulación de lípidos la cual alcanza hasta 50% de su biomasa seca, capacidad de adaptación a condiciones adversas (alta concentración salina, iones metálicos, alta presión de CO<sub>2</sub>), y menos necesidades nutricionales y ambientales en comparación a las plantas. Aún así, el costo de la producción de biodiesel a partir de algas sigue siendo más alto que el del diesel derivado del petróleo (Penglin *et al.*, 2011). Además las condiciones ideales para el almacenamiento de lípidos por parte de las algas unicelulares se obtienen cuando existe baja concentración de nutrientes, especialmente nitrógeno, lo cual tiene como consecuencia una baja producción de biomasa lo que resulta contraproducente (Loera-Quezada y Olguín, 2010). Dentro de las algas se encuentra el género *Chlorella*, el cual está formado por algas unicelulares capaces de almacenar una gran cantidad de lípidos con un perfil ideal para la producción de biodiesel. Esta especie cuenta con estudios previos en los cuales se evalúan sus condiciones óptimas de producción de lípidos, así como las fuentes de carbono que puede utilizar para este fin.

Además de las algas, existen algunas levaduras con alta capacidad de almacenar lípidos, y cuyo perfil de lípidos prácticamente está compuesto de triacilglicéridos (TAGs) de cadena larga, dichos lípidos son ideales para la producción de biodiesel (Li-Xia *et al.*, 2009). Otra ventaja de la producción de lípidos a partir de microorganismos es que estos pueden utilizar productos de desecho de las industrias y transformarlas en productos de interés, con lo cual se cumple con el cometido de ser una tecnología amigable con el medio ambiente. Por su parte dentro de las levaduras se encuentra el género *Rhodotorula*, el cual cuenta también con varios estudios que demuestran su capacidad de producción de lípidos.

Aunque se cuentan con estudios previos de la producción de lípidos por ambos microorganismos, tanto las condiciones como el proceso de producción, se encuentran aún en fase experimental, por lo cual en el presente trabajo se evaluaron distintas condiciones para el crecimiento y producción de lípidos por parte de ambos microorganismos, así como la generación de un consorcio alga-levadura entre *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* para el aumento de la eficiencia de producción de lípidos con potencial uso en la fabricación de biocombustibles.

## 2. HIPÓTESIS

Existe mayor producción de biomasa y acumulación de lípidos en *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* cuando se encuentran en un consorcio alga-levadura en comparación a los microorganismos por separado.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y comparar el crecimiento, producción de biomasa, acumulación de lípidos y el perfil de ácidos grasos de *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* creciendo de manera independiente y al combinarlas en un consorcio alga-levadura.

### **4. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar la producción de biomasa y acumulación de lípidos para *Rhodotorula mucilaginosa* y *Chlorella pyrenoidosa* de manera independiente, en sus condiciones idóneas.
2. Diseñar las condiciones para un cultivo mixto en el que puedan desarrollarse ambas cepas.
3. Evaluar y comparar la producción de biomasa y acumulación de lípidos en el cultivo mixto para ambas cepas de manera independiente y en conjunto.
4. Analizar y comparar los ácidos grasos presentes en las cepas creciendo por separado y en conjunto.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 COMBUSTIBLES DERIVADOS DEL PETRÓLEO

A través de las últimas décadas se han explotado los recursos derivados del petróleo o combustibles fósiles para la producción de combustibles (gasolina, diesel, aceites lubricantes, carbón, gas natural) como medio de generación de energía para el transporte y la industria; sin embargo dichos combustibles provienen de una fuente limitada y no renovable, por lo que los expertos prevén que en las décadas posteriores estos recursos se verán agotados, mientras que las necesidades mundiales de combustibles seguirán en aumento.

En adición a la limitación de la fuente de los combustibles derivados del petróleo, estos presentan impurezas provenientes de compuestos azufrados y nitrogenados por lo que durante su combustión generan gases nocivos para el medio ambiente conocidos como NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub> (Óxidos de Nitrógeno y Óxidos de azufre), los cuales a su vez contribuyen a la generación del efecto invernadero y a la lluvia ácida. Los combustibles fósiles generalmente presentan además remanentes de plomo, los cuales son lanzados al medio ambiente durante la combustión del diesel, el plomo es altamente tóxico para el ser humano, a nivel de sistema nervioso central, sistema circulatorio y sistema reproductor (Cho *et al.*, 2004). Aunado a esto cuando se utilizan combustibles fósiles en motores de combustión interna estos pueden producir una combustión incompleta, lo cual genera otros contaminantes entre ellos el monóxido de carbono (CO) que contribuye al efecto invernadero y compuestos aromáticos polinucleares los cuales son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos. Además del impacto ambiental que producen las impurezas presentes en los combustibles fósiles, dichas impurezas también ocasionan un fuerte ataque químico en los motores diesel en la bomba inyectora, válvula de escape y colector de gases de los vehículos, por lo cual la generación de un combustible libre de contaminantes corrosivos es de interés también de los fabricantes de motores diesel.

La ventaja que tienen los combustibles fósiles sobre otras fuentes de energía es que suelen ser más económicos y relativamente fáciles de obtener, por lo que se ha creado una gran dependencia hacia ellos. El uso de combustibles fósiles si bien es de lo más económico hoy en día entre las fuentes de energía, genera impactos globales severos debido a que afecta la estabilidad ambiental, económica y social de la población (Loera-Quezada y Olguín, 2010).

Por todo lo anterior los gobiernos, las industrias y la comunidad científica se encuentran en una continua búsqueda de nuevos combustibles y energéticos provenientes de fuentes renovables, económicas y amigables con el medio ambiente, que replacen a los combustibles derivados del petróleo en un futuro cercano y que satisfagan la demanda de energéticos de la población mundial sin poner en riesgo la estabilidad económica, social y ambiental (Patil *et al.*, 2008).

## **5.2 BIOCOMBUSTIBLES**

Un biocombustible puede ser definido en general como un combustible en forma sólida, líquida o gaseosa que consista de o es derivado de biomasa. En comparación con otras fuentes renovables de energía los biocombustibles presentan la ventaja de permitir “acumular” energía solar en forma de combustible, esto cuando se utilizan plantas o algas como materia prima para su producción (Scott *et al.*, 2010). Dentro de estos biocombustibles se encuentran el bioetanol y el biodiesel los cuales son los mayormente producidos y disponibles a nivel mundial, los cuales se cree podrían sustituir a la gasolina y al diesel en la industria del transporte (Scott *et al.*, 2010).

El biodiesel se define como una mezcla de ésteres monoalquílicos de cadena larga proveniente de una fuente biológica renovable, este puede utilizarse en forma pura o mezclarse con diesel proveniente de fuentes fósiles. Este biodiesel se obtiene a partir de triacilglicéridos (TAGs) provenientes de distintos organismos (plantas, semillas oleaginosas, microorganismos oleaginosos, aceites vegetales o grasas animales

comestibles recicladas), los cuales son posteriormente “transesterificados”, esto quiere decir que se hacen reaccionar con un alcohol de bajo peso molecular (generalmente metanol) bajo condiciones de temperatura y pH elevadas, con lo cual se obtienen como productos de la reacción alquil-ésteres (metil-ésteres cuando se utiliza metanol) de cadena larga como producto primario los cuales pueden ser utilizados como biodiesel o ser mezclados con otros combustibles, y glicerol como producto secundario del proceso, el cual a su vez tiene aplicaciones industriales o puede llegar a utilizarse como materia prima para el crecimiento de microorganismos oleaginosos.

En 1900 Rudolph Diesel (1858 – 1913), quien fue el creador del motor que lleva su nombre, fue el primero en fabricar biodiesel a partir de aceite de maní, sin embargo este biodiesel fue remplazado por el diesel generado a partir del petróleo el cual es más económico (Vyas *et al.*, 2010). Sin embargo, en la actualidad se ha retomado la búsqueda de fuentes renovables para la producción de biodiesel debido a las desventajas e impactos causados por los combustibles derivados del petróleo ya antes mencionados (Patil *et al.*, 2008). En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo del proceso general de producción de biodiesel (Loera-Quezada y Olguin, 2010).

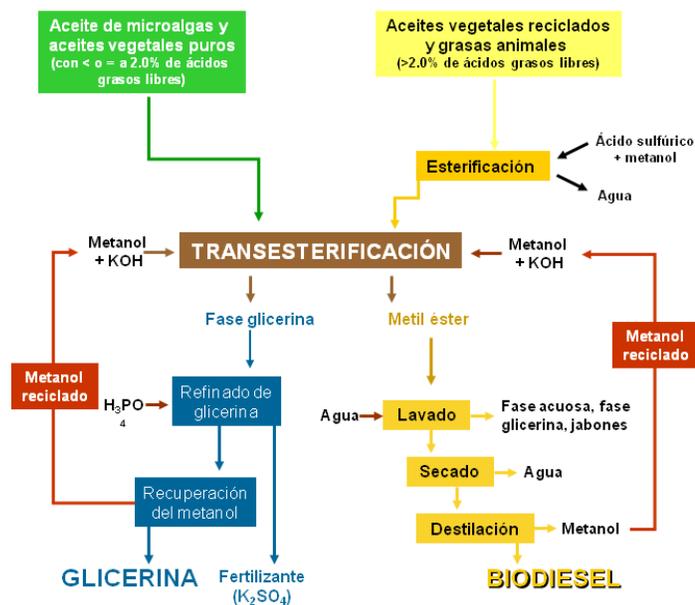


Figura 1. Diagrama general del proceso de fabricación de biodiesel (Loera-Quezada y Olguin, 2010)

El biodiesel es uno de los combustibles utilizados en el transporte que provienen de una fuente renovable y que ha mostrado aceptación a nivel mundial, esto basado en el World Bank Report de 2008, en el que se reportó una producción de 6,500 millones de litros de biodiesel a nivel mundial, de los cuales 75% fueron producidos en la Unión Europea, 13% en los Estados Unidos y el resto en otros países, sin embargo esta producción apenas aporta el 0,14% de los requerimientos de combustible a nivel mundial, es por esto que los países desarrollados buscan aumentar por lo menos 5 veces la producción y uso de biodiesel al llegar al 2020 (Dourval-Courchesne *et al.*, 2009), prueba de esto es que una de las metas del Departamento de Energía (DOE) de los Estados Unidos tiene como meta para el 2030 el producir un billón de toneladas anuales de biomasa, ya que a partir de esta biomasa se obtendrían aproximadamente 5% de la energía eléctrica necesaria, 20% de los combustibles para el transporte y 25% de las sustancias químicas, todo esto con respecto a las necesidades de dicho país (Kausch *et al.*, 2010).

El biodiesel además de provenir de una fuente renovable, produce menos contaminantes que el diesel de petróleo, ya que se ha demostrado que es biodegradable, está libre de compuestos aromáticos polinucleares y sus emisiones de SOx, monóxido de carbono (CO) y combustible no consumido liberados al ambiente son menores en comparación a los combustibles fósiles y sus emisiones netas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) son 78% menos que la del diesel de petróleo, con lo cual se podrían reducir los efectos de la lluvia ácida, efecto invernadero y emisión de compuestos tóxicos al medio ambiente (Chun-Hai *et al.*, 2010). En la tabla I se observa la comparación de emisiones de biodiesel comparadas con el diesel derivado del petróleo, en esta se pueden observar las ventajas ecológicas del biodiesel sobre el diesel derivado de petróleo, ya que los únicos compuestos nocivos para el medio ambiente cuyas emisiones se ven aumentadas en el biodiesel son los NOx y esto es en un porcentaje mínimo, de cualquier manera al evaluar la totalidad de las emisiones del biodiesel se observa que son mucho menores en comparación al combustible derivado del petróleo.

**Tabla I.- Comparación de emisiones promedio entre biodiesel y diesel derivado de petróleo<sup>1</sup>.**

<b>Tipo de emisión</b>	<b>B20 (%)*</b>	<b>B100 (%)**</b>
Hidrocarburos sin consumir	-20	-67
CO	-12	-48
CO <sub>2</sub>	-16	-79
Partículas	-12	-47
NOx	+2	+10
SOx	-20	-100
Aromáticos Policíclicos	-13	-80
Aromáticos Policíclicos Nitrogenados	-50	-90

<sup>1</sup> Tomado de Vyas *et al.*, (2010)

\* 20% de biodiesel y 80% de diesel de petróleo

\*\*100% de biodiesel

Actualmente existen plantas generadoras de biodiesel las cuales en su mayoría utilizan aceites vegetales como materia prima, tales como los aceites de soya, de palma, de maíz y de jatropha; sin embargo, estas fuentes de lípidos para la producción de biodiesel no satisfacen la creciente demanda de combustibles y presentan ciertas desventajas, tales como el uso de recursos agrícolas y alimenticios, lo cual puede generar un alza en los costos de alimentos al destinar recursos agrícolas a la industria de los combustibles, así como el uso de grandes extensiones de terrenos destinados a la producción agrícola. Como ejemplo podemos mencionar que en 2008 el Reino Unido utilizó aproximadamente 47,000 millones de litros de combustibles para el transporte, de éstos el 53% utilizado fue diesel, si se hubiera utilizado biodiesel proveniente de semillas o vegetales oleaginosos para suplir dicha necesidad de diesel, la cantidad de extensión agrícola requerida para su producción hubiese sido de alrededor de 1,75 millones de hectáreas, lo cual muestra que esto sería inviable, por lo cual es necesario

continuar con la búsqueda de nuevas opciones para la producción de biodiesel (Scott *et al.*, 2010).

Cabe mencionar también que los aceites vegetales se pueden obtener de los desechos derivados de la industria alimenticia, los cuales pueden ser reutilizados y transesterificados y así ser aplicados como materia prima en la producción de biodiesel; sin embargo, esto difícilmente solventaría la creciente necesidad mundial de combustibles, además estos aceites después de ser calentados para la producción de alimentos pueden polimerizarse y reaccionar generando compuestos aromáticos que durante su combustión generan compuestos tóxicos y nocivos para el medio ambiente (Penglin *et al.*, 2011).

Como desventaja para la producción de biodiesel podemos mencionar que esta puede ser hasta 70-80% más costosa que la fabricación de diesel derivado de combustibles fósiles, por lo que el enfoque actual está puesto sobre la optimización de las condiciones de generación de biodiesel a partir de materias primas menos costosas y renovables, por medio de métodos más económicos y eficientes (Chuan-Chao *et al.*, 2007).

Por todo lo anterior, los científicos han planteado y evaluado la posibilidad del uso de microorganismos como productores de lípidos como materia prima para la fabricación de biodiesel. Los microorganismos con alta capacidad de acumulación de lípidos se conocen como microorganismos oleaginosos, y entran en esta clasificación si pueden acumular más de 20% de lípidos con respecto al peso de su biomasa seca (Muhid *et al.*, 2008).

Entre los organismos más importantes en la producción de biodiesel se encuentran las algas unicelulares, las cuales cuentan con gran potencial para la producción de biodiesel, tales como ciclo de vida corto (alrededor de 24 h), alto porcentaje de almacenamiento de lípidos (de hasta un 50%), alta capacidad de adaptación en ambientes con condiciones adversas (alta salinidad, alta concentración de iones metálicos, presencia de compuestos tóxicos y alta concentración de CO<sub>2</sub>), además que presentan menos requerimientos nutricionales y ambientales en comparación a las plantas (Penglin *et al.*, 2011).

También dentro de los microorganismos productores de lípidos para la fabricación de biodiesel se pueden mencionar algunas levaduras oleaginosas, ya que se ha observado que dichos organismos tienen una tasa de crecimiento muy rápida en comparación a las algas y mucho mayor en comparación a las plantas y pueden producir lípidos a partir de distintas fuentes de carbono tales como xilosa, arabinosa, glicerol y distintos desechos industriales (Zhen-Ming *et al.*, 2010).

El proceso de producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos consiste a grandes rasgos en cultivar un microorganismo (algas o levaduras generalmente), producir la mayor cantidad de biomasa posible, separar la biomasa del medio líquido, extraer los lípidos de dicha biomasa y por último realizar la transesterificación de los triacilglicéridos para producir metil-ésteres de cadena larga los cuales pueden ser utilizados como combustibles.

A manera de comparación entre la producción de biodiesel por medio del uso de aceites vegetales contra microorganismos (datos estimados en base a experimentos a nivel laboratorio), en la tabla II se muestran algunas fuentes de biodiesel y sus estimaciones para abastecer el 50% de los requerimientos de combustibles en E.U.A.

**Tabla II.- Comparación en rendimiento de fuentes de biodiesel<sup>1</sup>**

<b>Cultivo</b>	<b>Rendimiento Aproximado <sup>a</sup></b>	<b>Área de cultivo Requerida <sup>b</sup></b>
Maíz	172	1540
Soya	446	594
Canola	1,190	223
Coco	2,689	99
Aceite de Palma	5,950	45
Microorganismo A <sup>c</sup>	136,900	2
Microorganismo B <sup>d</sup>	58,700	4.5

<sup>1</sup>Tomado de Castillo *et al.*, (2010)

<sup>a</sup> Rendimiento en Litros/Hectárea

<sup>b</sup> Territorio necesario en Millones de Hectáreas

<sup>c</sup> Con un Microorganismo que acumula 70% de lípidos respecto a su biomasa (Basado en datos obtenidos de biorreactores)

<sup>d</sup> Con un Microorganismo que acumula 30% de lípidos respecto a su biomasa (Basado en extrapolaciones de datos obtenidos de biorreactores).

## 5.3 MICROORGANISMOS CON ALTA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS

### 5.3.1 ALGAS UNICELULARES

Las algas unicelulares son organismos simples, presentes en todos los ecosistemas terrestres, pueden ser eucariotas (Clorophytas) o procariotas (Cianobacterias) y son capaces de realizar fotosíntesis, y existen más de 50,000 especies de algas, la colección más grande de estas se encuentra en la Universidad de Coimbra (Portugal) con más de 4,000 cepas registradas (Mata *et al.*, 2010). Las algas cuentan entre sus aplicaciones la producción de distintos metabolitos de interés para los seres humanos dentro de los cuales se encuentran las clorofilas, las xantofilas, los carotenoides, la luteína y los lípidos (Camacho-Rubio *et al.*, 1987). Además son organismos de interés industrial debido a que se han utilizado diversas cepas de algas a partir de las cuales se han realizado tratamientos de aguas residuales con el fin de reducir la cantidad de compuestos nitrogenados, metales pesados y demanda química de oxígeno (Wang *et al.*, 2009).

A partir de muchas de estas cepas se han llevado a cabo programas de tamizaje para evaluar su capacidad de acumulación de lípidos y su velocidad de crecimiento, la mayoría de estas pruebas fueron realizadas durante las décadas de 1980-1990 y fueron financiadas por el Programa de Especies Acuáticas del Departamento de Energía de los Estados Unidos (Aquatic Species Program US) el cual otorgó cerca de 25 millones de dólares a estas investigaciones (Liang *et al.*, 2009), a raíz de estas pruebas fue que los estudios se comenzaron a concentrar en un menor número de cepas de rápido crecimiento y alta acumulación de lípidos (Scott *et al.*, 2010).

Las algas unicelulares destacan entre los microorganismos como una alternativa conveniente para la producción de triacilgliceridos y su posterior transformación a biodiesel, debido a que muchas de estas se pueden cultivar en fotobiorreactores en los

cuales solo requieren energía solar, agua, sales y CO<sub>2</sub> para crecer y producir metabolitos tales como los lípidos.

Las microalgas son los organismos fotosintéticos más eficientes debido a que fijan la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> ya que 1 Kg de biomasa de algas requiere alrededor de 1,8 Kg de CO<sub>2</sub> (Rodolfi *et al.*, 2009) al incorporarlo al ciclo de Calvin y utilizarlo como fuente de carbono, con lo cual a su vez mitigan los efectos generados por la quema de combustibles reduciendo la generación del efecto invernadero, liberan una gran cantidad de oxígeno al medio ambiente, tienen un ciclo de vida muy corto en el cual en 24 h o menos pueden llegar a duplicar su biomasa, cuentan con altos rendimientos de lípidos (aproximadamente 20 veces mayor que los aceites vegetales), no requieren de herbicidas o plaguicidas durante su crecimiento en comparación a los vegetales y ocupan poco espacio para su producción por lo que se estima que para satisfacer las necesidades de diesel en México solo se utilizaría el 1% del territorio nacional en instalaciones de producción. Aunado a lo anterior las algas pueden ser cultivadas en agua de mar o aguas residuales de descargas industriales, reduciendo así el consumo de agua potable en procesos industriales e incluso diezmando los impactos ambientales generados por las descargas de las industrias al reducir contaminantes en dichos efluentes acuosos (Loera-Quezada y Olguín, 2010).

Las algas pueden utilizar lípidos a partir de sustratos orgánicos (glucosa, acetato) e inorgánicos (CO<sub>2</sub>), los lípidos que producen se dividen principalmente en lípidos neutrales (triglicéridos, colesterol) y lípidos polares (fosfolípidos, galactolípidos etc.), de estos lípidos los triglicéridos son los que se utilizan como materia prima para la producción de biodiesel. Las rutas sintéticas de los triglicéridos en las algas consisten a grandes rasgos en 3 pasos: a) formación de acetyl-CoA en el citoplasma, b) elongación y desaturación de la cadena carbonada del ácido graso, y c) biosíntesis de triglicéridos. El primer paso ocurre cuando a través de glucosa o CO<sub>2</sub> se genera gliceraldehído fosfato, el cual es posteriormente transformado a piruvato, y de este se obtiene acetyl-CoA; sin embargo, parte de esta glucosa no se transporta inmediatamente a la vía de la glicolisis, ya que se almacena como almidón en algunas especies de algas. El segundo paso de

elongación y desaturación de la cadena carbonada del ácido graso depende principalmente de 2 enzimas, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa.

Dentro de las algas unicelulares se han observado que existen especies productoras de lípidos, entre las cuales algunas de las mejor estudiadas son *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Monodus subterraneus*, *Scenedesmus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaedactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, así como los géneros *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Isochrysis* y *Chlorella* (Scott *et al.*, 2010).

En la Tabla III se menciona el contenido de lípidos en peso seco de algunas microalgas oleaginosas utilizadas para producción de lípidos, así como sus rendimientos diarios, reportados por distintos autores.

**Tabla III.- Contenido de lípidos de algunas especies de microalgas**

Especie	Contenido de lípidos <sup>a</sup>	Productividad <sup>b</sup>	Referencia
<i>Parietochoris incisa</i>	60	NR	Slovchenko <i>et al.</i> (2008)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	60	204	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	56	13.22	Gouveia <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	42	12.77	Widjaja <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	41.4	82	Mendoza <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	43	NR	Mandal y Mallick. (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	38	133	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>Nannochloropsis sp</i>	28.7	90	Gouveia y Oliveira. (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	27	127	Francisco <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlorella sp.</i>	10.0 - 48.0	42.1	Mata <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	30.7	151	Chiu <i>et al.</i> (2009)
<i>Dunaliella sp.</i>	67	33.5	Takagi <i>et al.</i> (2006)
<i>Choricystis minor</i>	21.3	82	Mazzuca-Sobzuk y Chisti. (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i>	50.3	NR	Xiong <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i>	21	54	Liang <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i>	73	NR	Matsunaga <i>et al.</i> (2009)

<sup>a</sup> Contenido de lípidos en porcentaje en relación a su biomasa seca

<sup>b</sup> Productividad de lípidos en mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>

NR.- No reportado

A partir de dichos lípidos obtenidos de las microalgas, se ha realizado la transesterificación y producción de biodiesel, en la tabla IV, podemos observar algunas de las características de este biodiesel, y su comparación contra el diesel derivado del petróleo y con los estándares establecidos para el biodiesel según la ASTM (American Society for Testing and Materials).

**Tabla IV.- Características de biodiesel producido a partir de algas y comparación con diesel de petróleo<sup>1</sup>**

<b>Propiedades</b>	<b>Biodiesel de Aceite de Algas</b>	<b>Diesel de Petróleo</b>	<b>Estándar según ASTM</b>
Densidad (Kg/L)	0.864	0.838	0.84 – 0.9
Viscosidad (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> a 40°C)	5.2	1.9 – 4.1	3.5 – 5
Punto de ignición (°C)	115	75	Mínimo 100
Punto de Fusión (°C)	-12	-50 a 10	No reportado
mg KOH/g	0.374	Máximo 0.5	Máximo 0.5
Proporción Hidrógeno/Carbono	1.81	1.81	No reportado

<sup>1</sup>Tomado de Huang et al. (2010)

En la Figura 2 se pueden apreciar algunas microfotografías de cepas oleaginosas de algas unicelulares.

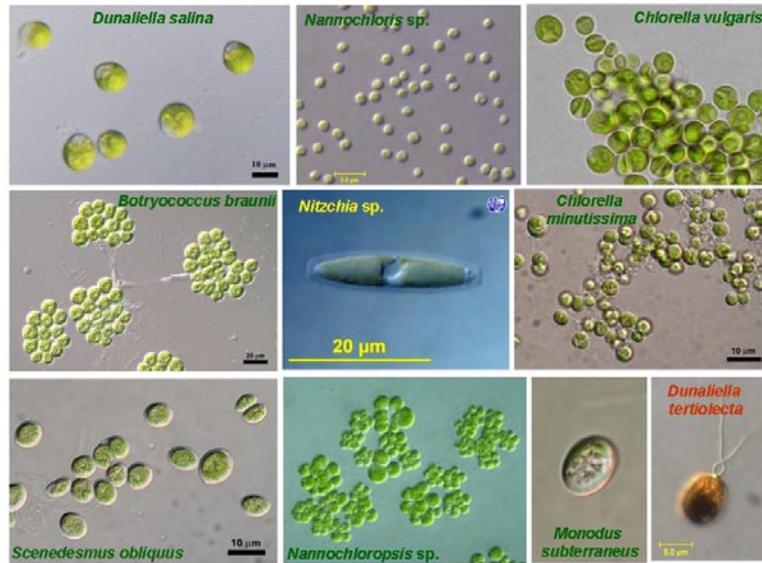


Figura 2.- Distintas cepas de algas oleaginosas (Tomado de Loera-Quezada y Olguin, 2010)

### 5.3.1.1. *Chlorella*

El género *Chlorella* está formado por algas verdes unicelulares de forma esférica y con un diámetro de 2 a 10  $\mu\text{m}$ . Presentan crecimiento autótrofo en medios compuestos únicamente por sales inorgánicas en presencia de luz, y crecimiento heterótrofo cuando se encuentra en medios con sustratos orgánicos y en ausencia de luz, por lo que se considera un organismo anfitrófico, y cuando se conjugan ambas condiciones tanto un medio con sustratos orgánicos y fotones de luz se presenta el crecimiento mixótrofo en el cual se lleva a cabo fotosíntesis y a su vez se utiliza el carbono de las fuentes orgánicas (Scarsella *et al.*, 2009).

Aunque se cuenta con estudios previos de este género aún se continúa en búsqueda de las condiciones óptimas de crecimiento y producción de lípidos. Dentro de este género se ha utilizado el alga *C. protothecoides* con lo que se han obtenido rendimientos de lípidos de hasta 55% con respecto al total de su biomasa, los cuales fueron extraídos con hexano y posteriormente transesterificados (Miao y Wu, 2006).

Después esta misma especie fue utilizada a mayor escala mediante el uso de fermentadores y utilizando jarabe hidrolizado de maíz como fuente de carbono en lugar de glucosa debido a que es más económico, obteniendo resultados similares pero a mayor escala y con menores costos (Miao y Wu, 2006). Se ha observado también que al utilizar un cultivo tipo fed-batch (cultivo tipo lote alimentado en el que se agregan nuevos nutrientes cada cierto tiempo) se puede incrementar ligeramente la producción de lípidos logrando llegar hasta a un 57.8% del total de la biomasa (Xiong *et al.*, 2008).

A su vez se ha evaluado el uso de distintos productos de desecho como fuentes de carbono tales como el almidón de la yuca, proveniente de desechos de la industria alimenticia. Se reportó que al utilizar dicha fuente de carbono los rendimientos en la producción de lípidos aumentaban en más de 20% en comparación a los cultivos que utilizaron glucosa como fuente de carbono (Wei *et al.*, 2009), además se ha demostrado que al utilizar cultivos heterótrofos o mixótrofos con esta cepa, los rendimientos en cuanto a producción de lípidos aumentan (Heredia-Arroyo *et al.*, 2010).

Se han evaluado también otras especies en el mismo género de *Chlorella*, como es el caso de *C. vulgaris* la cual fue capaz de desarrollarse y producir lípidos en un medio con hasta 10% de CO<sub>2</sub> lo cual revela que además de ser apta para la producción de biodiesel, también puede ser útil para reducir el CO<sub>2</sub> en el ambiente (Yoo *et al.*, 2010).

En otro estudio realizado en la Universidad de Granada en España se utilizó una cepa de *C. pyrenoidosa* y se hizo crecer en un medio a base de residuos de la producción de aceite de oliva (Residuo conocido como Alpechín), en dicho estudio se utilizó una concentración inicial de Alpechín de 10% y las condiciones de crecimiento utilizadas fueron 30° C de temperatura, agitación de 165 rpm y 6.5 de pH inicial, con el que se obtuvo hasta 1,1 g/L/h de biomasa al utilizar un biorreactor con iluminación constante (Sánchez *et al.*, 2001).

Se ha demostrado además que la producción de lípidos por parte de las algas se ve incrementada cuando estas se encuentran en un medio que contenga bajos niveles de nitrógeno (Yeh y Chang, 2011), esto se observa de manera marcada cuando la proporción carbono/nitrógeno es mayor a 20, y con concentraciones de glucosa entre 5-

10 g/L (Chen y Jhons, 1991), se ha reportado además que concentraciones más elevadas de glucosa o azúcares reducen tanto la tasa de crecimiento como la acumulación de lípidos en este género (Liang *et al.*, 2009).

En caso de insuficiencia de nitrógeno las algas unicelulares acumulan lípidos como un medio de almacenamiento en presencia de otros nutrientes tales como luz, CO<sub>2</sub>, o alguna fuente externa de carbono (Dorval-Courchesne *et al.*, 2009). Como ejemplo en la Figura 3 se pueden observar las diferencias en porcentaje entre las macromoléculas producidas por el alga *C. protothecoides* en relación al peso seco de su biomasa, al crecer en un medio con concentraciones bajas de nitrógeno y en un medio con concentraciones altas de nitrógeno y 10g/L de glucosa como fuente de carbono, en esta figura se puede observar como las condiciones nutricionales del medio de cultivo no afectan significativamente las concentraciones de DNA y RNA, sin embargo las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos se ven alteradas, ya que se aumenta la concentración de lípidos, mientras las concentraciones de carbohidratos y proteínas disminuyen.

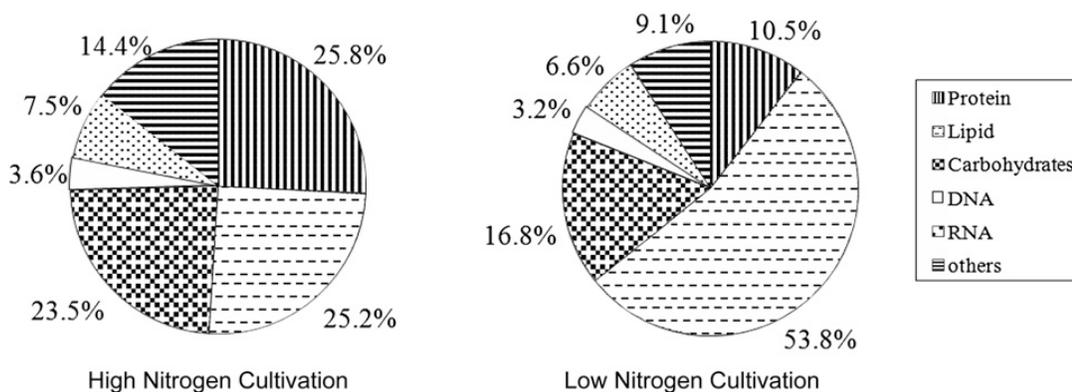


Figura 3. Macromoléculas presentes en *C. protothecoides* en distintos medios de cultivo (Tomado de Wei-Xiong *et al.*, 2010)

### 5.3.2 LEVADURAS

En general las levaduras tienen una mayor capacidad de acumular lípidos que las bacterias y similar a la de las algas. También se ha observado que el uso de levaduras para la producción de lípidos tiene diversas ventajas tales como, un ciclo de vida muy rápido, alto contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos idóneo para la producción de biodiesel. Sin embargo, de todas las especies de levaduras existentes se estima que menos del 5% tiene la capacidad de acumular más del 25% de lípidos con respecto al peso de su biomasa seca (Ageitos *et al.*, 2011).

Hasta la fecha se han utilizado distintas especies de levaduras para producción de lípidos, dentro de estas se mencionan principalmente a *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporon pullulan* y *Yarrowia lipolytica* (Li *et al.*, 2009; Loera-Quezada y Olguin, 2010) las cuales se han cultivado exitosamente y producido lípidos a través de diversas fuentes de carbono, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, glicerol, además de distintos desechos de la agricultura y la industria.

Los lípidos presentes en dichas levaduras presentan perfiles que en muchos casos son idóneos para la producción de biodiesel, y en algunos otros casos pueden ser utilizados en la industria alimenticia, debido a que algunas levaduras tienen la capacidad de sintetizar lípidos similares a los presentes en la semilla de cacao, con altos porcentajes de ácido esteárico y porcentajes parecidos de ácido oleico y palmítico, o incluso algunas levaduras tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos omega 3 y omega 6, los cuales se ha observado que presentan propiedades nutricionales y terapéuticas importantes (Li-Xia *et al.*, 2009).

En la tabla V se muestran algunas de las cepas de levaduras oleaginosas, la fuente de carbono utilizada para cada una en los respectivos estudios y sus porcentajes de acumulación de lípidos con respecto al peso seco de su biomasa.

**Tabla V.- Distintas cepas de levaduras oleaginosas**

Levadura	Sustrato utilizado	Porcentaje de Lípidos	Referencia
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Hidrolizado de tapioca	52.9	Mei <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glucosa	40.0	Pan <i>et al.</i> (1986)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Etanol	54	Yamauchi <i>et al.</i> (1986)
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glucosa	48	Li <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glucosa	53	Hassan <i>et al.</i> (1996)
<i>Cryptococcus echinulata</i>	Glucosa	46	Fakas <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptococcus isabellina</i>	Glucosa	44.6	Fakas <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptococcus isabellina</i>	Xilosa	65.5	Fakas <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptococcus echinulata</i>	Xilosa	57.7	Fakas <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glucosa	67.5	Li <i>et al.</i> (2007)

Las rutas metabólicas para la biosíntesis de lípidos en las levaduras oleaginosas no son muy distintas de las levaduras no oleaginosas, y no existen diferencias en cuanto a la captación de glucosa entre las distintas especies de levaduras, aun así los géneros de *Rhodotorula* y *Cryptococcus* pueden acumular más del 40% de lípidos, mientras que *Sacharomyces* y *Candida* solo alcanzan entre el 5-10% creciendo bajo las mismas condiciones, debido a que las levaduras no oleaginosas convierten el exceso de carbono en almidones y polisacáridos en lugar de sintetizar lípidos. Una de las grandes diferencias entre levaduras oleaginosas y no oleaginosas es la cantidad de citrato a nivel mitocondrial, ya que se encuentra 3 veces más elevado en las levaduras oleaginosas que en las levaduras no oleaginosas, este citrato es catalizado después para producir Acetil-CoA la cual es utilizada para la síntesis de lípidos.

Las levaduras oleaginosas que se desarrollan en medios ricos en fuente de carbono y con niveles bajos de nitrógeno pueden incrementar su capacidad de acumulación de

lípidos, esto ocurre debido a que bajo estas condiciones la actividad de la NADH-Isocitrato deshidrogenasa disminuye o incluso desaparece en las mitocondrias de las levaduras oleaginosas, con lo cual el Ciclo del ácido Cítrico se ve reprimido, las rutas metabólicas se alteran, diezmando la síntesis de proteínas y comenzando la síntesis de lípidos (Chi *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 1981).

Tanto en hongos y levaduras la síntesis de lípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y la primer enzima involucrada es la acetil-CoA Carboxilasa (ACC), la cual cataliza la conversión de acetil-CoA a malonyl-CoA, esta juega un rol clave en la biosíntesis de lípidos, para dicho proceso se requiere NADPH como fuente de equivalentes de reducción, este NADPH es producido por la enzima málica (EM) al catalizar el paso de Malato a Piruvato, además se requiere una gran cantidad de acetil-CoA como bloque de construcción de los triglicéridos, este bloque de construcción se obtiene a través de otra enzima clave en la biosíntesis de lípidos en levaduras, la ATP-citrato liasa (ACL) la cual se encarga de producir acetil-CoA a partir de citrato. Estas enzimas que son clave en la biosíntesis de lípidos ven aumentada su actividad durante el crecimiento en medios con concentraciones limitadas de nitrógeno. En hongos y levaduras se ha observado también que para la producción de ácidos grasos insaturados se requiere un complejo enzimático unido a membrana que tiene acción desaturasa, estas reacciones de desaturación tienen lugar principalmente en el retículo endoplásmico (Loateng *et al.*, 2011).

### **5.3.2.1 *Rhodotorula***

Entre las levaduras que se han estudiado recientemente para la producción de lípidos como materia prima para fabricación de biodiesel, se encuentra el género *Rhodotorula* el cual se encuentra dentro de la familia de Cryptococcoceae y a su vez dentro del orden de los Blastomycetos y está formado por levaduras pigmentadas muy características debido a su coloración roja, naranja o rosada, pueden presentar forma esférica, ovoide o elongada, pueden llegar a formar pseudohifas y la formación de hifas es nula, el género

*Rhodotorula* se divide a su vez en dos subgéneros *Rhodotorula* y *Flavotorulua*, división basada principalmente en los espectros de absorción de sus pigmentos. Este género ha sido estudiado debido a sus diversas aplicaciones a nivel comercial dado que los carotenoides presentes en este pueden tener beneficios para la salud de humanos y animales con actividades antioxidantes potentes, como el Beta-caroteno, el toruleno y el thorularodino los cuales pueden ser utilizados también como pigmentos de grado alimenticio principalmente en productos provenientes de la acuicultura como pescados y mariscos (Libkind *et al.*, 2009).

Dentro de este género una de las especies más estudiadas es *R. glutinis*, esta fue la primera cepa de *Rhodotorula* descrita en 1928 por Harrison, de la cual se han evaluado distintas condiciones de crecimiento y se encontró que puede acumular hasta un 49% de lípidos en relación a su biomasa a nivel de laboratorio, y hasta 60% a nivel de biorreactor cuando se le suministra glucosa como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno (Cuan-Chao *et al.*, 2007), además al utilizar esta cepa es posible utilizar productos de desecho para su desarrollo ya que se ha observado que es capaz de producir hasta un 20% de lípidos con respecto a su biomasa a partir de agua de desecho proveniente de la producción de glutamato monosódico a la cual se le añadió glucosa (Xue *et al.*, 2008).

Existen especies con capacidad de crecer en ambientes extremos, tal es el caso de las cepas pertenecientes a la especie *R. glacialis* la cual es una levadura psicrófila que fue aislada de ambientes glaciales, esta cepa puede desarrollarse y acumular lípidos en rangos de temperatura que van desde los  $-3^{\circ}\text{C}$  hasta los  $20^{\circ}\text{C}$ . Se reportó que para esta cepa la temperatura de crecimiento fijada entre los rangos antes mencionados no afectó significativamente la producción de lípidos y biomasa, sin embargo la concentración de glucosa si lo hizo, ya que los máximos porcentajes de producción de lípidos se obtuvieron al utilizar 120 g/L de glucosa en el medio de cultivo, esta concentración de glucosa correspondía a una proporción de carbono/nitrógeno (C/N) de 149. Por otra parte ambas temperatura y concentración de glucosa afectaron el perfil de lípidos ya que el grado de insaturaciones decrecía en cuanto se aumentaba cualquiera de los factores mencionados (Amaretti *et al.*, 2010).

Se ha encontrado también, que algunas cepas de este género son capaces de producir lípidos en proporciones mayores a 30% respecto a su biomasa cuando se utilizan otras fuentes de carbono tales como xilosa o glicerol (Easterling *et al.*, 2009).

Existen también algunas otras cepas del genero *Rhodotorula* que si bien, no han sido tan estudiadas, también tienen potencial en la producción de lípidos, como es el caso de *R. mucilaginosa*, esta levadura se ha aislado de aire, tierra, lagos y océanos. Presenta colonias rosas-anaranjadas de rápido crecimiento que pueden ir desde lisas, rugosas hasta mucosas en agar PDA (Reyes-Chávez, 2005). En la siguiente tabla se anexa la información taxonómica de ésta.

**Tabla VI.- Clasificación taxonómica de *R. mucilaginosa*<sup>1</sup>**

<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Basidiomicetes
<b>Clase</b>	Urediniomicetes
<b>Orden</b>	Esporidiales
<b>Familia</b>	Esporidiobolaceae
<b>Género</b>	<i>Rhodotorula</i>
<b>Especie</b>	<i>mucilaginosa</i>

<sup>1</sup>Tomado de Harrison. (1929)

*R. mucilaginosa* se ha utilizado para producir lípidos a partir de productos de desecho, como es el caso del almidón de tapioca, en un estudio reciente se utilizó dicho almidón para el desarrollo de *R. mucilaginosa* y se obtuvieron porcentajes de 48% y 53% de lípidos con respecto a su biomasa en un cultivo tipo batch y fed-batch respectivamente (Mei *et al.*, 2009).

También se han utilizado nutrientes tales como la inulina con el cual se obtuvieron rendimientos de lípidos de hasta 52%, de los cuales hasta un 87% estaban conformados por triacilglicéridos de entre 16 y 18 carbonos, los cuales son idóneos para la fabricación de biodiesel (Chun-Hai *et al.*, 2010). Se encontró también que uno de los mejores rendimientos se logró cuando se utilizó un medio con 8% de melazas y 1 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, logrando un porcentaje de lípidos de 69.5% (Karatay y Dönmez, 2010).

### 5.3.3 CONSORCIO Y SINERGIA ALGA-LEVADURA

Se han reportado a nuestro conocimiento dos estudios en los cuales mediante el uso de un alga y una levadura en conjunto se ha logrado incrementar las tasas de crecimiento y los rendimientos de acumulación de lípidos. En uno de ellos se utilizó una cepa del alga *C. vulgaris* y otra de la levadura *R. glutinis*, y se evaluó la acumulación de lípidos de los organismos por separado y después en conjunto, utilizando productos de desecho de la industria de los alimentos como medio de cultivo. Los productos de desecho fueron descargas de una procesadora de alimentos del mar y melazas provenientes de una procesadora de azúcar de caña, y se observó que es posible el generar un consorcio alga-levadura que aumente los rendimientos de acumulación de lípidos por parte de los microorganismos, en el estudio se reporta que esto puede deberse entre otras razones, a que tanto la levadura le proporciona CO<sub>2</sub> al alga y por su parte el alga le proporciona O<sub>2</sub> a la levadura, además que se planteó que pueden existir algunos otros metabolitos producidos por las algas que pueden favorecer el crecimiento de las levaduras y viceversa. Se observó además que el crecimiento de ambas cepas fue más rápido cuando se colocaron en conjunto que por separado. Durante dicho estudio se estableció que las mejores condiciones para el crecimiento de ambas especies fue a un pH de 5, con 1% de melazas como fuente de carbono y con agitación a 200 rpm, en ciclos de luz oscuridad de 16:8 h, bajo estas condiciones se alcanzaron porcentajes de acumulación de lípidos de hasta un 62% con respecto al total de la biomasa de ambas especies (Cheirsilp *et al.*, 2011).

En otro estudio se utilizó el alga *Spirulina platensis* y la levadura *Rhodotorula glutinis*, durante este estudio se utilizaron 3 medios de cultivo, uno especial para levaduras, uno especial para algas y uno diseñado para el crecimiento de ambas. El cultivo mixto se llevó a cabo al cultivar el alga y la levadura de manera conjunta en el medio diseñado para ambas cepas, durante 5 días a 30°C, con agitación a 140 rpm y con iluminación continua, y se obtuvieron rendimientos de 3,67 g/L de biomasa seca con un 12.7% de lípidos totales, lo cual reditúa en 0,47 g/L (gramos de lípidos por litro de

medio de cultivo) totales. En comparación a las cepas creciendo por separado en ese mismo medio los rendimientos de biomasa se incrementaron hasta en más de 10 veces y se duplicaron los porcentajes de lípidos por gramo de biomasa seca. Además utilizaron aguas residuales de la industria alimenticia (preparación de glutamato monosódico) como medio de cultivo para ambas cepas, de esta agua de desecho se logró remover un 73% de la demanda química de oxígeno (DQO) y un 35% de los residuos de sales de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y se obtuvieron rendimientos de biomasa de 1,6 g/L y un porcentaje de lípidos de 13,75% por gramo de biomasa seca. Con lo anterior en este estudio se concluye que la relación alga-levadura es de sinergismo y no solo de adición y que no existe competencia aparente entre ambas cepas por los nutrientes en el medio (Xue *et al.*, 2010).

Hasta el momento y a nuestro conocimiento, estos son los únicos dos reportes que existen de un consorcio alga-levadura, en los cuales ambos mostraron una relación sinérgica en cuanto a tasa de crecimiento y en cuanto a la acumulación de lípidos al utilizar ambas cepas en el mismo cultivo.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL

#### 6.1.1 CEPAS

Durante el presente estudio se utilizaron las cepas *Chlorella pyrenoidosa*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Sacharomyces cerevisiae* obtenidas del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas U.A.N.L.

#### 6.1.2 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Para el crecimiento de la cepa de *C. pyrenoidosa* se utilizó una solución de sales (patente pendiente) con 10 g/L de Glucosa, y para su mantenimiento se utilizó un medio sólido preparado a partir de la misma solución de sales con adición de 15 g/L de agar bacteriológico como solidificante. Las soluciones de sales fueron proporcionadas por el Dr. Ulrico Javier López del Laboratorio de Ciencias de los Alimentos y Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas U.A.N.L (López-Chuken *et al.*, 2010).

Mientras que para las cepas de *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae* se utilizó un medio de cultivo con: 25 g/L de glucosa, 12.5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 10 g/L de extracto de levadura para su crecimiento, y el medio PDA (Patata Dextrosa Agar) para su mantenimiento.

### 6.1.3 REACTIVOS

Durante el presente trabajo se utilizaron Reactivos de las Siguietes Casas Comerciales y Departamentos:

- Almacén General de reactivos F.C.Q.

Glucosa, Medio PDA, Agua destilada, Solución de Azul de Metileno, Hidróxido de Sodio, Sulfato de Sodio, Cloruro de Sodio, Éter de Petróleo y todas las Sales utilizadas en la preparación de medios de Cultivo.

- CTR Scientific (Monterrey, Nuevo León, México)

Cloroformo grado reactivo, metanol grado reactivo.

- Sigma-Aldrich Química S.A (Toluca, México)

Solución metanólica de trifluoruro de boro al 14%.

- Supelco (E.U.A.).

Mezcla de metil-ésteres de ácidos grasos FAME Mix 37.

#### 6.1.4 EQUIPO

El equipo utilizado durante el presente trabajo comprende:

- Balanza Analítica AND (San José, CA, E.U.A), modelo HR200.
- Esterilizador eléctrico ALL AMERICAN (Manitovoc, WI, E.U.A.), modelo 25X.
- Refrigerador TORREY (Monterrey, México), Modelo CH10.
- Campana de acrílico para ensayos microbiológicos.
- Incubadora con agitación LABTECH (México), modelo LSI-301.
- Microscopio Invertido LEICA (Solms, Alemania), modelo DMIL
- Centrifuga con refrigeración HETTICH (Tuttlingen, Alemania), modelo Universal 32R.
- Congelador (-70°C) Ultra low freezer , SO LOW ENVIROMENTAL EQUIPMENT (Cincinatti E.U.A.), Modelo U-8513.
- Liofilizadora LABCONCO (Kansas City, E.U.A.), modelo FreeZone.
- Mini Bead beater BIOSPEC (Bartlesville, OK, E.U.A), modelo 1107900-101.
- Rotavapor YAMATO (Illinois, E.U.A.), modelo RE200.
- Mini Incubadora LABNET (New Jersey, E.U.A), modelo I-510.
- Columna capilar de 30 m por 0.53 mm de diámetro interno y 0.5 µm de película SUPELCO (E.U.A.), modelo OmegaWax 530, con detector de ionización de flama.
- Cromatógrafo VARIAN (Nueva York, E.U.A) modelo 3700.

## 6.2 MÉTODOS

La estrategia general del estudio fue la siguiente: primero se evaluó la producción de biomasa y lípidos para las cepas de *R. mucilaginosa* y *C. pyrenoidosa* bajo condiciones idóneas de acumulación de lípidos para levaduras y algas respectivamente, de esta manera se logró identificar la capacidad oleaginosa de ambas cepas y se seleccionaron los medios de cultivo en los cuales la productividad fue mayor para cada cepa por separado. Una vez seleccionados los medios de cultivo en los cuales se observó la máxima productividad, se tomaron como base para el diseño de medios de cultivo mixto en los cuales ambas cepas se pudieron desarrollar adecuadamente. Una vez que obtuvimos los medios mixtos se evaluó la producción de biomasa y acumulación de lípidos de cada cepa creciendo en los medios mixtos, tanto para las cepas por separado, como en conjunto. Así se determinó la posibilidad de generar una sinergia entre ambos microorganismos para el aumento de la productividad de biomasa y lípidos y así se evaluó si la sinergia fue más efectiva que los microorganismos creciendo por separado bajo sus condiciones nutricionales idóneas. Por último, se analizaron los porcentajes de ácidos grasos presentes en los lípidos extraídos, tanto en las cepas por separado en sus condiciones idóneas, como de los microorganismos creciendo en conjunto, por medio de un perfil de ácidos grasos, y se compararon los perfiles de ácidos grasos para determinar la factibilidad del uso de estos como materia prima para la producción de biodiesel.

### **6.2.1 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN *Rhodotorula mucilaginosa* Y *Chlorella pyrenoidosa* DE MANERA INDEPENDIENTE, EN SUS CONDICIONES IDÓNEAS.**

### 6.2.1.1 Curvas de crecimiento en medios de enriquecimiento

Como primer paso de la evaluación se realizaron curvas de crecimiento para cada cepa en su respectivo medio de enriquecimiento, con esto se determinó en cuanto tiempo se alcanzó la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria, así como el tiempo en el que el crecimiento de las cepas fue equilibrado y de esta manera se inocularon los medios para producción de lípidos con un número similar de células vivas para cada experimento.

Para la curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* se tomó una asada del cultivo en medio PDA y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 100 mL del medio de cultivo para enriquecimiento, este se llevó a incubar a 30°C con agitación a 150 rpm (Incubadora Labtech LSI-301, México), y cada 12 h se tomó una muestra de 1 mL, se realizó una dilución 1:10, tomando 100 µL de la muestra y colocándola en 900 µL de solución salina estéril al 0.85%, se agitó con un ayuda de un vórtex por 15 s, de esta dilución se tomaron de nuevo 100 µL y se colocaron en un tubo Eppendorf con 100 µL de azul de metileno al 0.01%, la mezcla se incubó por 5 min y con esta solución se llenó la cámara de Neubauer, en la cual se realizó el conteo de las levaduras. Las células muertas se observaron teñidas en azul y las células vivas se observaron refringentes.

La curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* se realizó tomando una asada del cultivo en medio semisólido y transfiriéndola a 100 mL de la solución de sales para algas (Lopez-Chuken *et al.*, 2010) adicionada con 10 g/L de glucosa, este se llevó a incubar a 30°C con agitación a 150 rpm y con un foco blanco de 100 W como fuente de luz continua. De la misma manera se tomó 1 mL de muestra cada 12 h, realizando la dilución, tinción y conteo de la misma manera que con *R. mucilaginosa*.

### 6.2.1.2 Curvas de Crecimiento en medios para producción de lípidos y determinación del tiempo de los experimentos.

Una vez determinadas las curvas de crecimiento en medios de enriquecimiento, se procedió a inocular con 5 mL del cultivo en crecimiento equilibrado de cada cepa (30 h de incubación para *R. mucilaginosa* y 72 h para *C. pyrenoidosa*) los matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medios de cultivo para producción de lípidos respectivos para algas y levaduras, estos se incubaron a 30°C con agitación de 150 rpm (los matraces con *C. pyrenoidosa* se cubrieron para protegerlos de la luz y favorecer el crecimiento heterótrofo de la cepa), de estos se tomaron muestras de 1 mL cada 24 h, realizando la respectiva dilución, tinción y conteo que en las curvas para los medios de enriquecimiento. Con esto se determinó en cuanto tiempo se alcanzó la fase estacionaria en los medios de producción de lípidos, y en cuanto tiempo se alcanzó la fase de muerte celular, para de esta manera incubar los matraces el tiempo suficiente para que se alcanzara el mayor tiempo posible de fase estacionaria debido a que se ha observado que durante la fase estacionaria es cuando se alcanza la máxima acumulación de lípidos, sin llegar al tiempo de muerte celular. Determinado el tiempo que tardó en llegar la cepa a la fase de muerte celular se estableció como tiempo de incubación idóneo para cada medio de cultivo. Posteriormente se realizaron los experimentos incubando por la cantidad determinada de días dependiendo de la cepa y el medio utilizados, para después separar la biomasa y realizar la extracción de lípidos.

Para el caso de *R. mucilaginosa* se utilizaron 4 medios para producción de lípidos, los cuales se muestran a continuación junto a su composición.

1. Medio Mínimo de Sales 1(MSM1, Someshekar y Joseph, 2000): glucosa = 40 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 0.4 g/L,  $\text{CaCl}_2$  = 0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 0.75 g/L, extracto de levadura = 1.5 g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  = 0.286 g/L.
2. Medio Bajo en Nitrógeno (BN, Medio modificado en el laboratorio): glucosa = 80 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 12.5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 5 g/L, extracto de levadura = 1.9 g/L.

3. Medio Limitado en Nitrógeno (NLM, Cuan-Chao *et al.*, 2007): glucosa = 100 g/L, extracto de levadura = 8 g/L, peptona = 3 g/L
4. Medio de Fermentación (FM, Cuimin-Hu *et al.*, 2009): glucosa = 54 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0.215$  g/L, extracto de levadura = 1.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.4$  g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 1.5$  g/L, pH = 6.

Por su parte para *C. pyrenoidosa* se utilizaron a su vez 4 medios de cultivo, los cuales se observan a continuación junto a su composición.

1. Medio Bajo en Nitrógeno (BN, Medio modificado en el laboratorio):  $\text{KNO}_3 = 0.101$  g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.027$  g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.098$  g/L,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 0.029$  g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 2.8$  mg/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 1.8$  mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.22$  mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 0.08$  mg/L,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 0.019$  mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 5.5$  mg/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA} = 7.3$  mg/L, glucosa = 10.0 g/L.
2. Medio BG11 modificado (BG11M, Leasing *et al.*, 2011):  $\text{NaNO}_3 = 1.5$  g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} = 0.4$  g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.075$  g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.036$  g/L, ácido cítrico = 6 mg/L, citrato de fierro y amonio = 6 mg/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA} = 1$  mg/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 0.02$  g/L, glucosa = 50.0 g/L, pH = 7.
3. Medio Bristol Modificado (BM, Leasing y Kookkhunthod, 2011):  $\text{NaNO}_3 = 0.25$  g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0.075$  g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.175$  g/L,  $\text{CaCl}_2 = 0.025$  g/L,  $\text{NaCl} = 0.025$  g/L,  $\text{MgSO}_4 = 0.075$  g/L,  $\text{FeCl}_3 = 0.3$  mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.3$  mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.2$  mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 0.2$  mg/L,  $\text{CuSO}_4 = 0.06$  mg/L, Glucosa = 20.0 g/L, pH = 7.
4. Medio Basal Modificado (MBM, Shen *et al.*, 2010):  $\text{KNO}_3 = 2.4$  g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1.25$  g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 1.0$  g/L,  $\text{EDTA} = 0.5$  g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 0.1142$  g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.111$  g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.0498$  g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.0882$  g/L,

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 0.0142 \text{ g/L}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 0.0157 \text{ g/L}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0.0049 \text{ g/L}$ , Glucosa = 40.0 g/L.

### **6.2.1.3 Determinación de la producción de biomasa y lípidos en *R. mucilaginosa* y *C. pyrenoidosa* en sus medios de cultivo idóneos.**

Una vez que se determinó mediante curvas de crecimiento el tiempo de incubación idóneo para cada cepa en los distintos medios de cultivo se procedió a realizar los experimentos de producción de biomasa y acumulación de lípidos. Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: las cepas de *R. mucilaginosa* y *C. pyrenoidosa* fueron activadas en sus medios de cultivo de enriquecimiento respectivos, esto se realizó tomando una asada del cultivo en medio semisólido y transfiriéndola al medio de cultivo líquido, la cepa de *R. mucilaginosa* se llevó a incubar entonces a una temperatura de 30°C con agitación a 150 rpm durante 30 h, una vez transcurrido este tiempo se tomaron 5 mL del cultivo en fase exponencial y se transfirieron a los medios de producción de lípidos antes mencionados, una vez inoculados los medios para producción de lípidos se llevaron a incubar bajo las mismas condiciones durante el tiempo determinado en las curvas de crecimiento. Por su parte, la cepa de *C. pyrenoidosa* se llevó a incubar a 30°C con agitación de 150 rpm y con un foco de luz blanca de 100 W como fuente de luz en su medio de enriquecimiento durante 72 h, una vez completado este periodo se tomaron 5 mL del cultivo y con ellos se inocularon los medios para producción de lípidos, estos medios de cultivo se llevaron a incubar bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación, pero sin fuente de iluminación y con los matraces protegidos de la luz para promover el metabolismo heterótrofo de las algas, esto se realizó durante el tiempo determinado en las curvas de crecimiento para cada medio de cultivo. Una vez cumplido el tiempo de incubación para cada cepa en cada respectivo medio, se procedió a separar la biomasa, para su posterior determinación gravimétrica y extracción de lípidos.

La separación de la biomasa se llevó a cabo por centrifugación (Hettich Zentrifugen, Universal 32R, Tuttlingen, Alemania) a 9000 rpm por 10 min, el pellet formado se lavó

con 50 mL de agua destilada aplicando vórtex por 3 min, seguido de esto, la biomasa se centrifugó nuevamente a 9000 rpm por 10 min para formar de nuevo el pellet, el sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 20 mL de agua destilada aplicando vórtex. Una vez resuspendida la biomasa, se separó en 2 partes iguales de 10 mL cada una, de estas una se utilizó para realizar la extracción de lípidos, y la otra mitad se llevó a secar para determinar su peso total.

La extracción de lípidos se realizó mediante un método modificado basado en los métodos de Folch *et al.* (1956) y Bligh y Dyer. (1959). Estos métodos se basan en la extracción tanto de los lípidos polares como no polares, lo cual se logra utilizando un solvente no polar (cloroformo), el cual disuelve los lípidos neutros, mezclado con un solvente polar (metanol), el cual disuelve los lípidos polares presentes en la muestra, todo esto seguido de un lavado de los solventes con solución salina para remover material no lipídico que se arrastra durante la extracción (González *et al.*, 2009). En este estudio la extracción se llevó a cabo utilizando una parte de la biomasa resuspendida en 10 mL de agua destilada estéril, la cual se maceró con ayuda de un Bead beater (Biospec 1107900-101, E.U.A.) de la siguiente manera: se llenó la cámara del Bead Beater con 2/3 de Beads (Biospec), se colocaron los 10 mL de muestra líquida, se colocó hielo con agua en la parte externa de la cámara de Bead Beater y se aplicaron 2 pulsos de 2.5 min respectivamente. La aplicación del Bead Beater nos permitió romper las paredes celulares de las algas y levaduras y así se liberaron los lípidos presentes en las células. El material resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, la cámara de Bead Beater se lavó con 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se transfirieron también al mismo matraz Erlenmeyer, entonces se agregaron 50 mL de una solución de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) en proporción 2:1, al matraz se agregó un agitador magnético y con ayuda de una placa de agitación se homogenizó la mezcla por 24 h. Transcurrido este tiempo la mezcla del matraz se transfirió a tubos falcon de 50 mL y se centrifugó por 5 min a 2500 rpm, con esto se separó la fase acuosa de la fase orgánica y se precipitaron los beads de la mezcla. La fase orgánica se separó con ayuda de una micropipeta de 1 mL de capacidad y se colocó en un nuevo tubo falcon de 50 mL. Seguido de esto la fase orgánica se lavó con 0.2 volúmenes (En relación a la cantidad

total de solvente obtenido, es decir 2 mL de solución salina por cada 10 mL de solvente) de solución salina (NaCl) al 0.85%, se aplicó vórtex por 1 min aproximadamente, y se centrifugó nuevamente por 5 min a 2500 rpm para separar la fase acuosa en donde se atrapó cualquier materia no lipídica que pudo arrastrarse, dicha fase se retiró con una micropipeta y se descartó. Los solventes presentes en la muestra se evaporaron con ayuda de un Rotaevaporador (Yamato, RE200, E.U.A.) en un matraz bola de 100 mL (Pyrex) previamente pesado, la rotaevaporación se realizó en condiciones de 45 °C por aproximadamente 10 min. Los solventes y la humedad restante de la muestra se eliminaron colocando la muestra en una mini-incubadora (Labnet I-510, E.U.A.) a 60°C hasta peso constante. El peso de los lípidos obtenido fue el correspondiente a los lípidos presentes en 50 mL de medio de cultivo, este dato se multiplicó por 20 para obtener los gramos de lípidos por litro de cultivo.

La obtención del peso total de la biomasa se realizó de la siguiente manera: La otra parte de 10 mL, se congeló a -70°C (So Low Environmental equipment, Ultra low freezer U-8513, Cincinatti E.U.A.) durante 24 h en viales de vidrio previamente pesados, transcurrido el tiempo de congelación se liofilizaron los viales por 8 h aproximadamente (liofilizadora LABCONCO, FreeZone, E.U.A.) y se pesaron nuevamente para obtener el peso total de la biomasa seca, correspondiente a la biomasa presente en 50 mL de medio de cultivo; este dato se multiplicó por 20 para obtener el peso de biomasa seca por litro de medio de cultivo.

Durante los experimentos se analizaron los siguientes controles: Como control positivo de la extracción de lípidos, se utilizó 1 g de grasa vegetal (manteca vegetal marca INCA que contiene alrededor de 98% de triglicéridos) el cual se trató de la misma manera que en la extracción de lípidos a la biomasa de las respectivas cepas, esto con el fin de asegurar que la extracción de lípidos se llevó a cabo de la manera correcta y que se alcanzó a recuperar una cantidad considerable de lípidos. Como control negativo se utilizó 1 g de glucosa a la cual también se le realizó una extracción de lípidos de la misma manera que a la biomasa, esto para asegurar que durante la extracción de lípidos no se acarreó materia orgánica no lipídica. Además se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* como microorganismo control ya que se ha observado que este es un microorganismo no

oleaginoso y que su capacidad de acumulación de lípidos ronda alrededor del 5% en relación a su biomasa seca, por lo que esta cepa se utilizó bajo las mismas condiciones en las que *R. mucilaginosa* acumuló la mayor cantidad de lípidos, esto con el fin de asegurar que durante la extracción de lípidos no se arrastró materia celular no lípida y que los resultados fueron precisos. Se realizó un experimento preliminar para cada cepa con cada medio de cultivo correspondiente, y se realizaron 3 repeticiones de los experimentos que mostraron la mayor productividad.

### **6.2.2. DISEÑO DE LAS CONDICIONES PARA UN CULTIVO MIXTO EN EL QUE PUEDAN DESARROLLARSE AMBAS CEPAS.**

El diseño de los medios mixtos se realizó fundamentándonos en los requerimientos nutrimentales tanto de algas y levaduras reportados en la bibliografía consultada (concentración de sales, pH, fuentes de carbono y nitrógeno), y se tomaron como base los medios de cultivo en los que se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a producción de lípidos en ambas cepas por separado.

Una vez planteados los medios de cultivo mixto se corroboró que los compuestos presentes en estos se encontrarán disponibles y no formarán complejos o precipitarán mediante la aplicación del programa Visual MINTEQ 3.0, este nos permitió realizar una modelación de equilibrio químico, ya que simula las interacciones entre compuestos en solución acuosa, este programa cuenta con una interfaz en la que se introdujo la concentración de las especies iónicas presentes en la solución así como la cantidad de carbono orgánico presente y de esta manera se analizaron los índices de saturación para cada especie de iones. Se predijo así que estas especies iónicas se encontraron disponibles para las cepas, a su vez mediante la aplicación de este programa nos aseguramos previamente a la preparación de los medios que las especies iónicas pudieron soportar la temperatura de esterilización por autoclave sin formar complejos que pudieran precipitar (Lunde *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011).

Los medios que se diseñaron se muestran a continuación junto con su composición.

1. Medio Mixto 1:  $\text{NaNO}_3$  1.2 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.38g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036, ácido cítrico 0.006 g/L, citrato de fierro y amonio 0.006 g/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.001 g/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 g/L, extracto de levadura 1.6 g/L, peptona 0.6 g/L, glucosa 50 g /L.
2. Medio Mixto 2:  $\text{NaNO}_3$  0.15 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.05 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036 g/L, citrato de fierro y amonio 0.01 g/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.001 g/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01 g/L, extracto de levadura 7.2 g/L, peptona 2.7 g/L, glucosa 100g/L.
3. Medio Mixto 3:  $\text{NaNO}_3$  0.75 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.018 g/L, ácido cítrico 0.003 g/L, citrato de fierro y amonio 0.003 g/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.001 g/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01, extracto de levadura 4 g/L, peptona 1.5 g/L, glucosa 75 g/L.
4. Medio Mixto 4:  $\text{NaNO}_3$  0.375 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.018 g/L, ácido cítrico 0.003 g/L, citrato de fierro y amonio 0.003 g/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.001 g/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05, extracto de levadura 2 g/L, peptona 0.75 g/L, glucosa 40 g/L.

Después de realizar el análisis con el software y confirmar que los nutrientes estuvieron disponibles para las cepas, se confirmó que ambas cepas de manera independiente pudieron desarrollarse correctamente en los medios diseñados y a su vez se determinó el tiempo óptimo de incubación para cada especie en cada uno de los diferentes medios mediante curvas de crecimiento, las cuales se realizaron de la misma manera que en el punto 6.2.1.2, con un inóculo de 5% de un cultivo en fase de crecimiento exponencial, tomando muestras de 1 mL cada 24 h y realizando conteos en

cámara de Nubauer con azul de metileno como colorante para diferenciar entre células vivas y muertas.

### **6.2.3. EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN EL CULTIVO MIXTO PARA AMBAS CEPAS DE MANERA INDEPENDIENTE Y EN CONJUNTO.**

#### **6.2.3.1 Evaluación de la producción de biomasa y acumulación de lípidos en el medio mixto para ambas cepas por separado.**

Una vez que se confirmó que en los medios diseñados ambas cepas fueron capaces de crecer, y que se determinó el tiempo óptimo de crecimiento de cada cepa de manera independiente en cada medio se procedió a determinar la producción de biomasa y lípidos para cada cepa por separado en cada medio mixto. Esto se llevó a cabo de la misma manera que se describió anteriormente en el punto 6.2.1.3, inoculando e incubando los medios, separando la biomasa, y determinando su peso y contenido total de lípidos. El medio mixto en el cual se observaron los mejores resultados para las cepas por separado se utilizó como medio para realizar el consorcio entre ambos microorganismos y así evaluar el desarrollo de una relación sinérgica.

#### **6.2.3.2 Evaluación de la producción de biomasa y acumulación de lípidos en el medio mixto para ambas cepas en conjunto.**

##### **6.2.3.2.1 Curvas de crecimiento de ambas cepas en conjunto.**

Para la determinación de la capacidad de ambos microorganismos de realizar una sinergia, a su vez se realizaron curvas de crecimiento, inoculando el Medio Mixto 1 (Medio en el que se observaron los mejores resultados) con ambas cepas de la siguiente manera:

- Curva de Sinergia 1: Se inoculó el Medio Mixto 1 con 4 mL de un cultivo de *C. pyrenoidosa* en fase exponencial y al mismo tiempo se inoculó con 1 mL de un cultivo de *R. mucilaginosa* en fase exponencial, con lo cual se inoculó una cantidad doble en número de células de alga en relación a la levadura, debido a que las levaduras tienen un menor tiempo de generación. Este cultivo se llevó a incubar a 30°C con agitación a 150 rpm sin luz.
- Curva de Sinergia 2: Se inoculó el Medio Mixto 1 con 4 mL de un cultivo en Fase exponencial de *C. pyrenoidosa*, y al mismo tiempo se inoculó con 0.5 mL de un cultivo de *R. mucilaginosa* en fase exponencial, con lo cual se inoculó una cantidad similar de células de algas y levaduras. El cultivo se llevó a incubar a 30°C con agitación a 150 rpm sin luz.
- Curva de Sinergia 3: Se inoculó el medio Mixto 1 con 4 mL de un cultivo de un cultivo de *C. pyrenoidosa*, y se llevó a incubar por 24 h a 30°C con agitación a 150 rpm sin luz, transcurrido este periodo se inoculó el medio de cultivo con 1 mL de un cultivo en fase exponencial de *R. mucilaginosa*, de la misma manera esto se realizó debido al menor tiempo de generación de las algas.

#### **6.2.3.2.2 Evaluación de la producción de biomasa y lípidos para ambas cepas en conjunto.**

Una vez realizadas las curvas de crecimiento con las tres distintas condiciones de inoculación, se utilizaron las condiciones 1 y 3 (debido a que mostraron índices de relación sinérgica en las curvas de crecimiento) para realizar los ensayos de producción de biomasa, lípidos y perfil de ácidos grasos. Estos se realizaron

utilizando los periodos de tiempo óptimos observados en las curvas de crecimiento, incubando a 30°C con agitación a 150 rpm, y sin contacto con luz para promover el metabolismo heterótrofo de las algas. La obtención de biomasa, lípidos y perfil de ácidos grasos se realizó como se mencionó en el punto 6.2.1.3.

#### **6.2.4. ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LAS CEPAS CRECIENDO POR SEPARADO Y EN CONJUNTO.**

Para realizar el perfil de ácidos grasos se realizaron tres experimentos de la manera detallada a continuación:

1. *C. pyrenoidosa* creciendo en medio BG-11 Modificado.
2. *R. mucilaginosa* creciendo en medio NLM.
3. *C. pyrenoidosa* y *R. mucilaginosa* creciendo en medio Mixto 1.

Los experimentos 1 y 2 se realizaron inoculando 2 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL del respectivo medio para cada una de las cepas con 12.5 mL de cultivos en fase exponencial de *C. pyrenoidosa* y *R. mucilaginosa* y llevando a incubar a 30°C con 150 rpm de agitación por el tiempo establecido en las curvas de crecimiento. El experimento 3 se llevó a cabo inoculando con 10 mL de un cultivo de *C. pyrenoidosa* y 2.5 mL de un cultivo de *R. mucilaginosa* (ambos en fase exponencial, Sinergia No. 1), dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con 500 mL de medio mixto 1, éstos se llevaron a incubar a 30°C con agitación de 150 rpm por el tiempo establecido durante las curvas de crecimiento (Los matraces que contenían *C. pyrenoidosa* se incubaron protegidos de la luz). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colectó la biomasa de ambos matraces mediante centrifugación y lavado con agua destilada. Toda la biomasa que se obtuvo de cada experimento, se utilizó para extraer los lípidos. Se realizaron pasos similares al método antes descrito, la biomasa recuperada se resuspendió en la mínima cantidad de agua destilada posible y se maceró con ayuda de un bead beater, con la

diferencia que la extracción se realizó utilizando únicamente cloroformo como solvente, para poder realizar su posterior análisis por cromatografía de gases. Después de la extracción el solvente se evaporó con ayuda de un rotaevaporador, y los lípidos obtenidos se llevaron a analizar al Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas.

El residuo remanente de cada muestra se hizo reaccionar con 6 mL de una solución metanólica de hidróxido de sodio 0.5 N y 7 mL de una solución metanólica de trifluoruro de boro al 14% (Sigma-Aldrich, Toluca, México), aplicando calor en el mismo matraz bajo reflujo. Posteriormente se añadieron 5 mL de éter de petróleo y 15 mL de una solución saturada de cloruro de sodio. El contenido del matraz se agitó y se dejó reposar para permitir la separación de las fases. Por último se transfirió cuidadosamente la fase etérea (Fase que contiene los ésteres metílicos de ácidos grasos) a un matraz, se aforó a 25 mL y se depositó en un vial ámbar que contenía 1 gramo de sulfato de sodio como agente desecante. Los ésteres metílicos se cuantificaron por cromatografía de gases en una columna capilar de 30 m por 0.53 mm de diámetro interno y 0.5  $\mu\text{m}$  de película (OmegaWax 530, Supelco, E.U.A.) con detector de ionización de flama. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la fase etérea en el cromatógrafo (Varian 3700, Nueva York E.U.A) para su análisis (AOAC, 2003). La grasa saturada e insaturada se calculó como la suma de sus respectivos ácidos grasos. Las temperaturas de trabajo fueron 250 °C para el inyector y detector. Se utilizó para el análisis de las muestras una temperatura inicial de 150 °C con incrementos de 7°C por min hasta una temperatura final de 220 °C sostenida por 20 min más. Se utilizó nitrógeno grado cromatográfico como gas acarreador con un flujo de 10 mL/min. Para el detector de ionización de flama se utilizaron hidrógeno grado cromatográfico y aire seco (punto de rocío -59°C máximo) libre de hidrocarburos (menos de 2 ppm de hidrocarburos equivalente a metano).

Antes del análisis de las muestras se inyectó en el cromatógrafo, como estándar y para optimizar la respuesta cromatográfica, una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (Mezcla FAME Mix 37, Supelco, E.U.A.). Los tiempos de retención para cada uno de los ésteres metílicos de ácidos grasos (C4 a C24) saturados e insaturados del

estándar comercial fueron registrados por el software del integrador y almacenados en el equipo para ser posteriormente comparados automáticamente con los tiempos de retención de los esteres metílicos registrados para cada muestra y así obtener la composición de ácidos grasos en las mismas.

### **6.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados están expresados como la Media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos diferentes. Los datos correspondientes a los resultados se analizaron con una prueba de Kolmogrov-Smirnov con la cual se verificó que estos mostraron una distribución normal. La comparación de las medias de los resultados se realizó utilizando el modelo estadístico de One-Way ANOVA utilizando una prueba de Scheffé. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS bajo la asesoría de la Doctora Martha Santoyo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CURVAS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INOCULACIÓN.

La curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en el medio de enriquecimiento arrojó los siguientes datos mostrados en la Figura 4. La fase de crecimiento exponencial de *R. mucilaginosa* se obtuvo entre las 12 y 48 h de incubación, y la fase estacionaria se alcanzó después de las 48 h de incubación, siendo el tiempo de crecimiento equilibrado a las 30 h aproximadamente por lo que fue el tiempo considerado para la inoculación de los experimentos de producción de biomasa y lípidos.

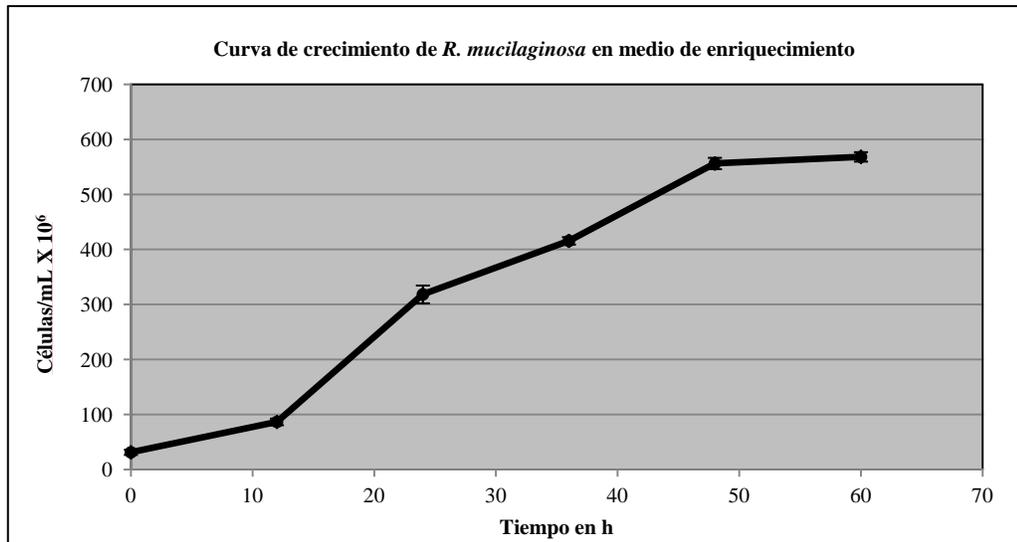


Figura 4. Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio de enriquecimiento.

Por su parte la curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* arrojó los siguientes datos mostrados en la Figura 5.

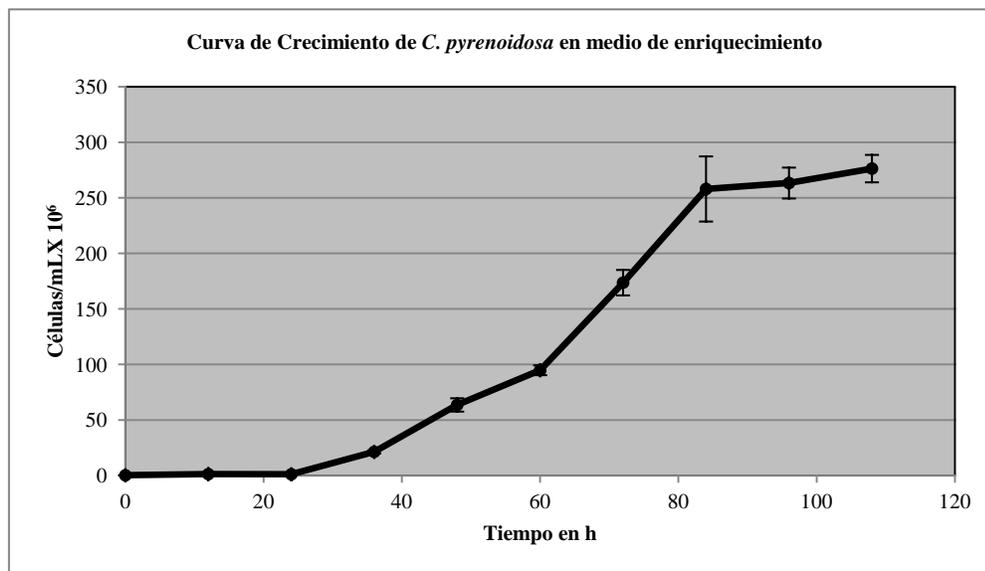


Figura 5.- Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en medio de enriquecimiento.

El alga *C. pyrenoidosa* mostró un crecimiento exponencial entre las 24 y las 80 h, siendo el tiempo de crecimiento equilibrado a las 72 h aproximadamente, por lo cual este fue el tiempo de incubación utilizado para la inoculación de los experimentos.

## **7.2 CURVAS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS PARA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE LOS EXPERIMENTOS.**

### **7.2.1 CURVAS DE CRECIMIENTO DE *R. mucilaginosa* EN MEDIOS PARA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS.**

Las curvas de crecimiento se realizaron de la manera descrita para ambas cepas en los medios de cultivo enumerados en el apartado de metodología. A continuación se observan los resultados en las siguientes figuras.

### Medio MSM1

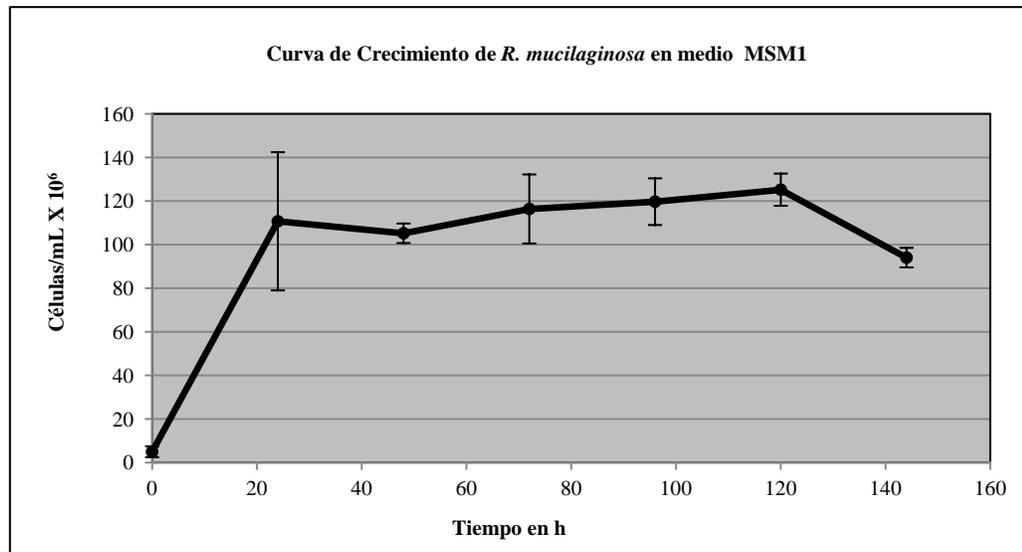


Figura 6. Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio MSM1.

En el medio MSM1 se observó que la fase estacionaria comenzó aproximadamente a las 24 h, mientras que la fase de muerte comenzó aproximadamente a las 144 h, por lo cual este es el tiempo de incubación que se utilizó para los experimentos de producción de biomasa y lípidos con este medio de cultivo.

## Medio BN

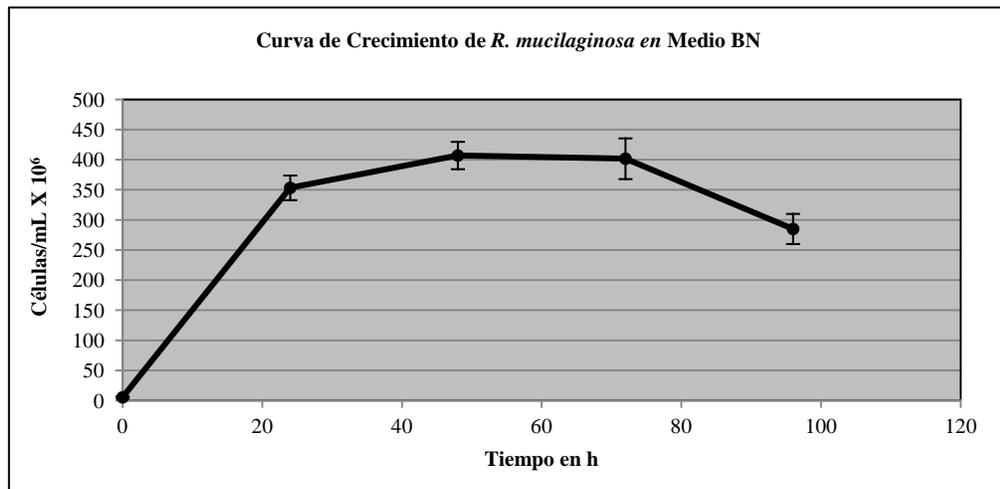


Figura 7. Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio BN.

En la curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en el medio BN se observó que la fase estacionaria se alcanzó a las 24 h, mientras que la fase de muerte celular se alcanzó a las 96 h, lo cual reveló una fase estacionaria relativamente corta, este tiempo se tomó como tiempo de incubación para los experimentos de producción de biomasa y acumulación de lípidos en este medio de cultivo.

## Medio NLM.

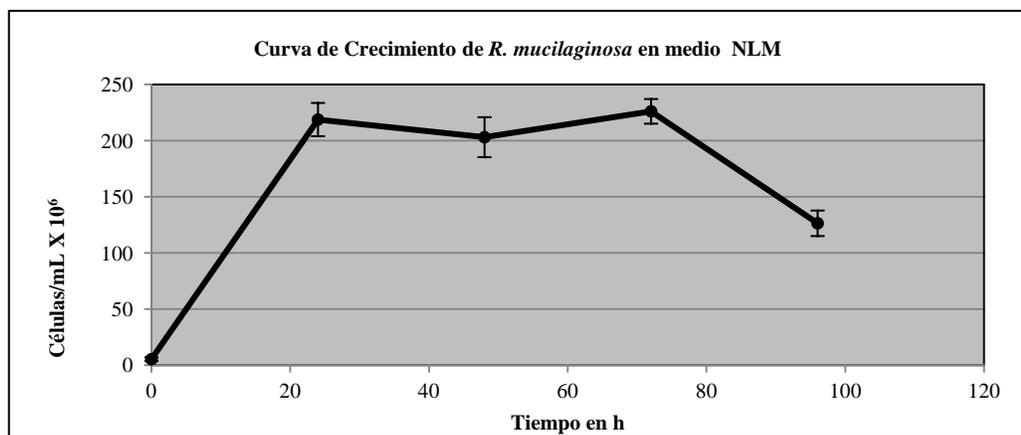


Figura 8. Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio NLM

En este medio de cultivo la fase estacionaria se alcanzó también a las 24 h mientras que la fase de muerte celular se alcanzó a las 96 h, este medio de cultivo reveló también una corta fase estacionaria. Para este medio de cultivo también se tomó 96 h de tiempo como periodo de incubación durante los experimentos de producción de biomasa y acumulación de lípidos.

### Medio FM

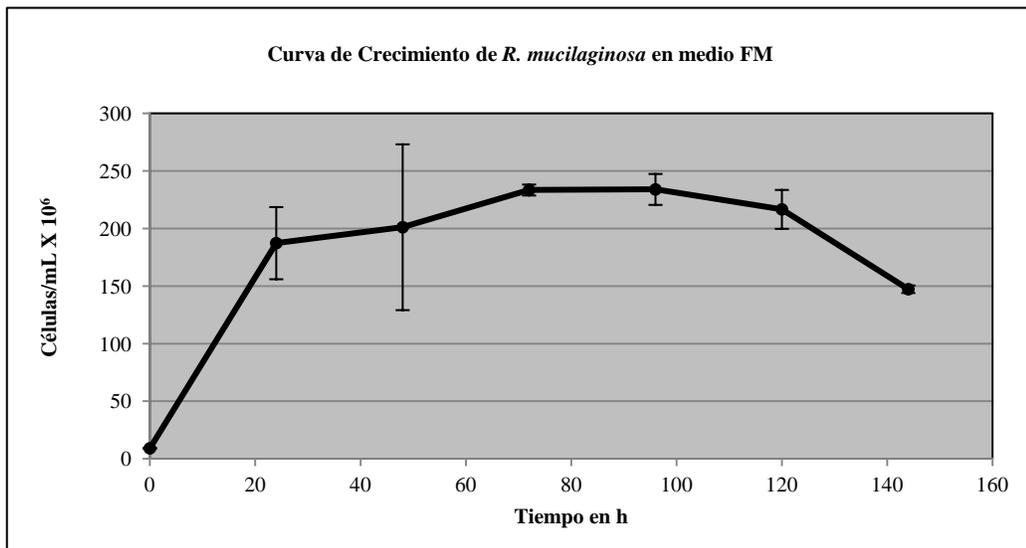


Figura 9. Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio FM

En este medio de cultivo la fase estacionaria se alcanzó también alrededor de las 24 h de incubación, mientras que la fase de muerte celular se observó hasta las 144 h, lo cual nos indica una fase estacionaria prolongada, 144 h fue el tiempo que se utilizó para los experimentos en este medio de cultivo

## 7.2.2 CURVAS DE CRECIMIENTO DE *C. pyrenoidosa* EN MEDIOS PARA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS.

Para el caso de *C. pyrenoidosa* se utilizaron los cuatro medios de cultivo antes mencionados y las curvas se realizaron como se describe en el apartado de metodología, los resultados se muestran en las figuras siguientes.

### Medio BN

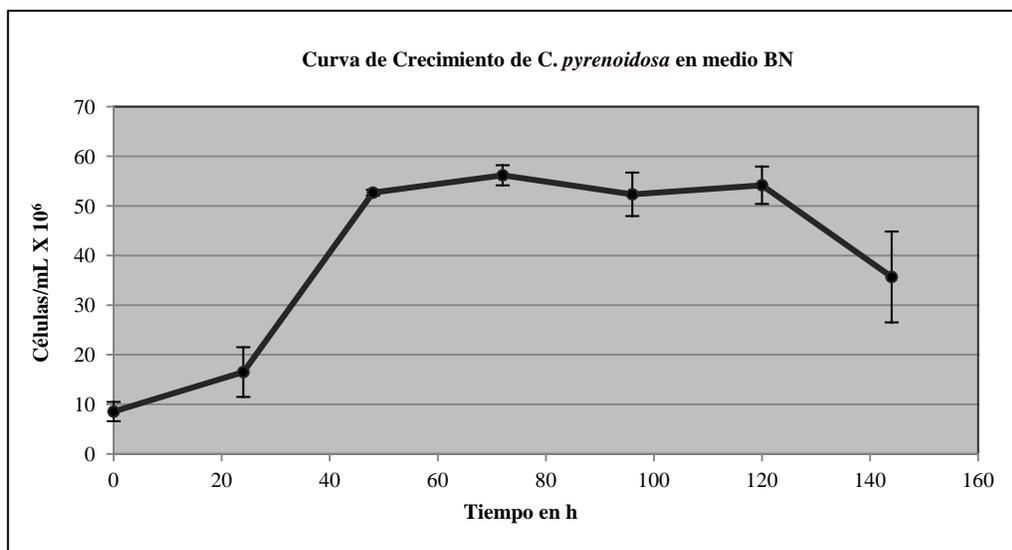


Figura 10. Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en Medio BN

En el caso de *C. pyrenoidosa* el tiempo de incubación en el que se alcanzó la fase de muerte celular fue más largo en comparación a *R. mucilaginosa*, en el medio BN se alcanzó la fase estacionaria a las 48 h, y la fase de muerte celular a las 144 h, por lo cual este fue el tiempo de incubación que se utilizó durante los experimentos para la producción de lípidos en este medio de cultivo.

## Medio BG11M

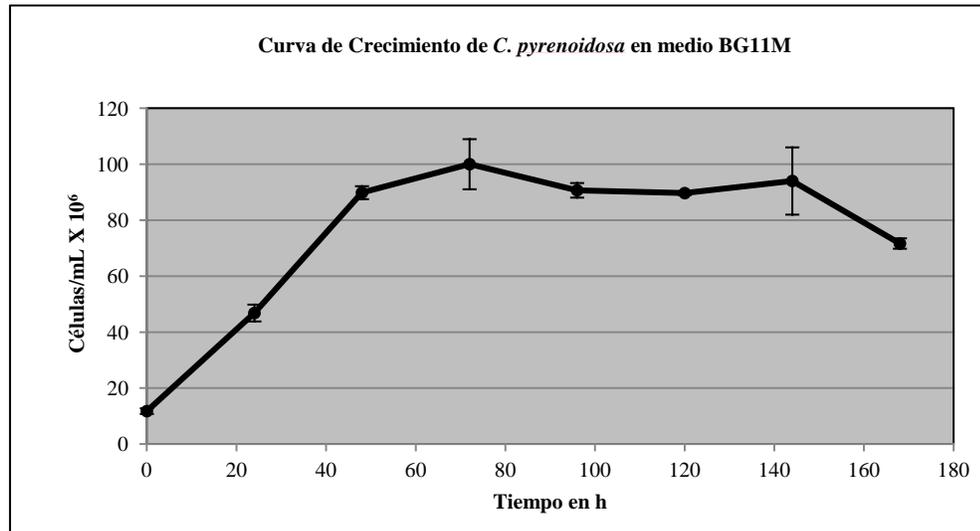


Figura 11. Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en medio BG11M.

El tiempo de incubación determinado para la producción de lípidos en medio BG11M fue de 168 h, ya que es el tiempo aproximado que duró la fase estacionaria.

## Medio BM

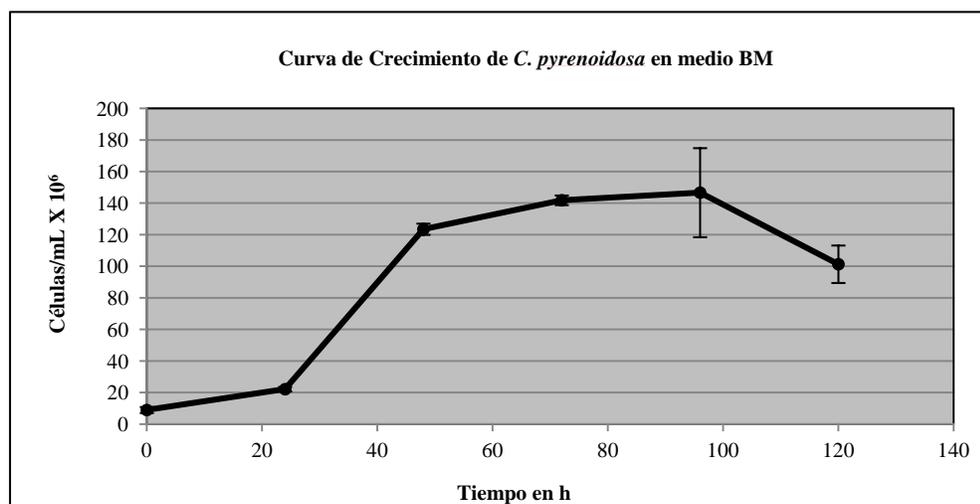


Figura 12. Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en medio BM.

En este medio de cultivo la fase estacionaria se alcanzó hasta las 48 h de incubación y se llegó a la fase de muerte celular a las 120 h. El tiempo estimado de incubación para producción de lípidos por *C. pyrenoidosa* en el medio BM fue de 120 h.

### Medio MBM

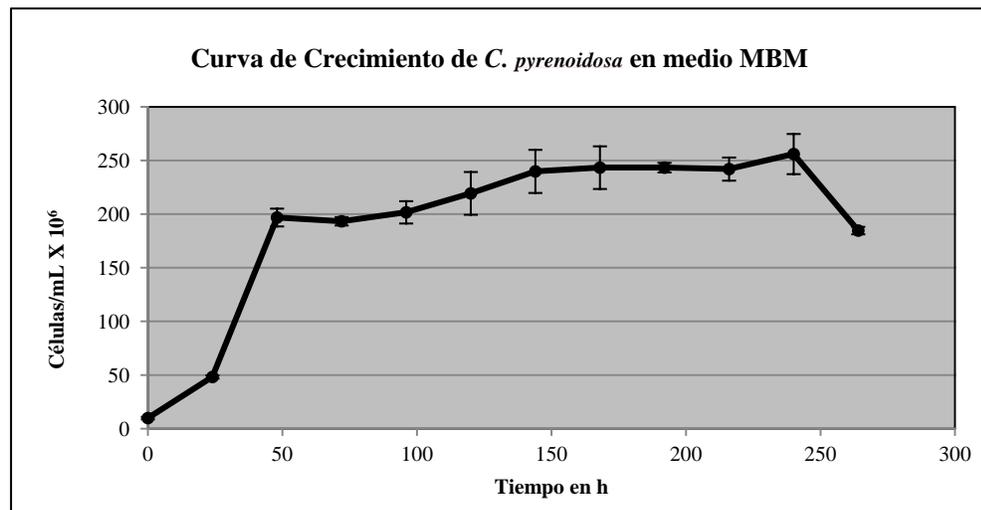


Figura 13.- Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en medio MBM.

Con el medio MBM se alcanzó la fase estacionaria a las 48 h y la fase de muerte celular hasta las 264 h, que fue el tiempo que se utilizó para los experimentos con dicho medio.

### 7.3 DISEÑO DE LAS CONDICIONES PARA UN CULTIVO MIXTO EN EL QUE PUEDAN DESARROLLARSE AMBAS CEPAS.

Una vez diseñados los medios de cultivo, se analizaron con ayuda del programa Visual Minteq 08, en dicho programa se obtuvieron equilibrios e índices de saturación idóneos para las especies iónicas utilizadas por lo que durante su preparación y esterilización por autoclave a 103.5 kPa por 15 min no se observó ningún tipo de precipitación o interacción nociva para el desarrollo experimental entre los compuestos presentes en dichos medios, por lo cual se continuó con la fase experimental. Los medios de cultivo mixtos se inocularon con un cultivo en fase exponencial para cada una de las cepas, y se realizaron curvas de crecimiento. A continuación se muestran las curvas de las cepas por separado en cada uno de los medios mixtos.

#### 7.3.1 CURVAS DE CRECIMIENTO PARA AMBAS CEPAS EN MEDIOS MIXTOS CRECIENDO DE MANERA INDEPENDIENTE.

##### 7.3.1.1. Medio Mixto 1

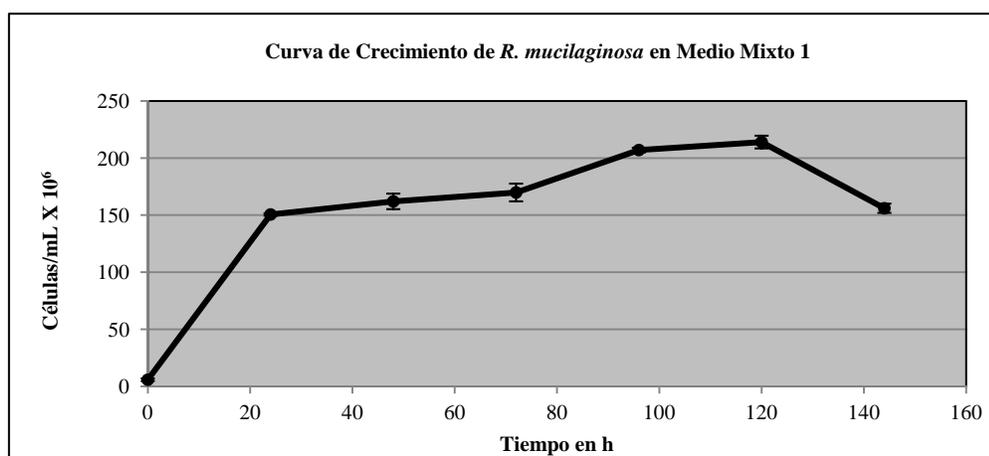


Figura 14. Curva de crecimiento de *R. mucilaginoso* en Medio Mixto 1

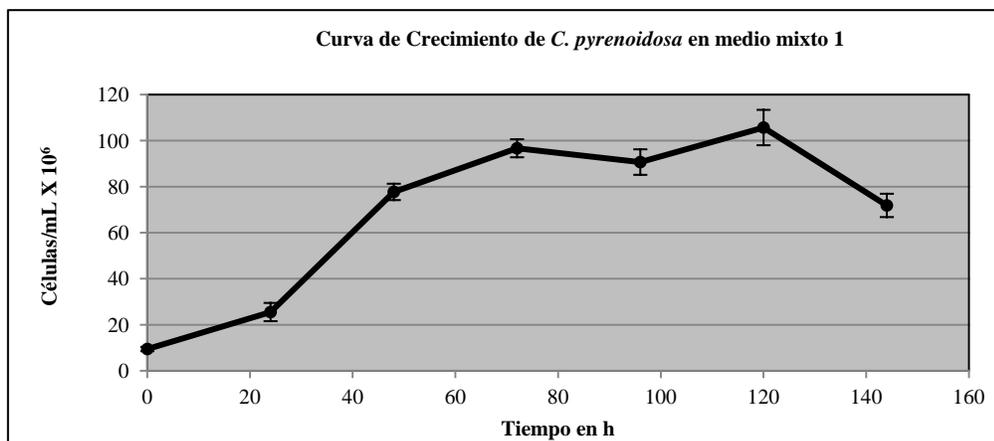


Figura 15. Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en Medio Mixto 1

En las figuras 14 y 15, se observa que en el medio mixto 1 los tiempos en los que los cultivos llegan a la fase de muerte celular para ambas cepas se alcanzó a las 144 h, este parámetro se tomó como tiempo óptimo de incubación y durante este periodo se realizaron los experimentos de producción de biomasa y lípidos en este medio.

### 7.3.1.2 Medio Mixto 2

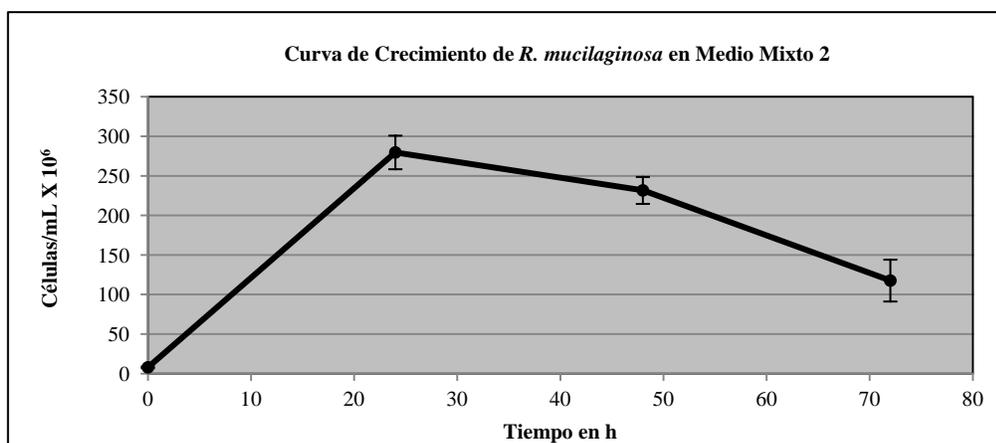


Figura 16.- Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en Medio Mixto 2

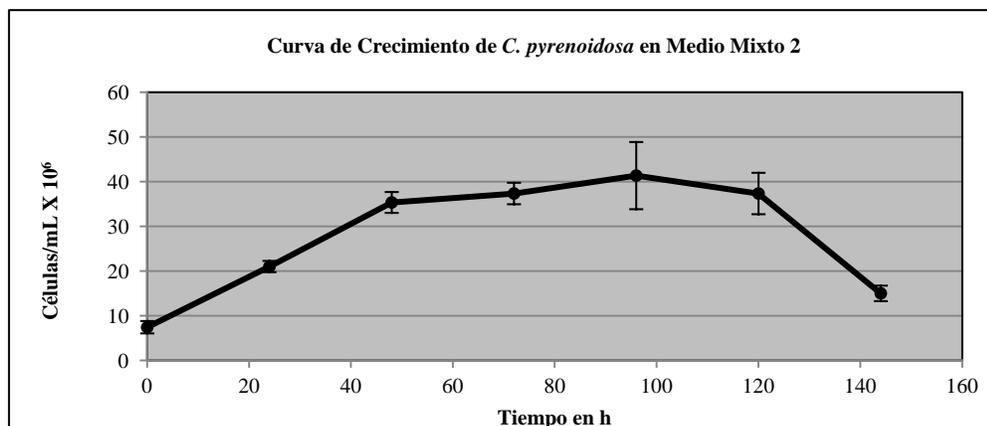


Figura 17.- Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en Medio Mixto 2

En las figuras 16 y 17, se observa que en el medio mixto 2 los tiempos en los que los cultivos llegan a la fase de muerte celular se dan entre las 72 y 144 h, este parámetro se tomó como tiempo óptimo de incubación para cada cepa respectivamente, y durante este periodo se realizaron los experimentos de producción de biomasa y lípidos en este medio.

### 7.3.1.3 Medio Mixto 3

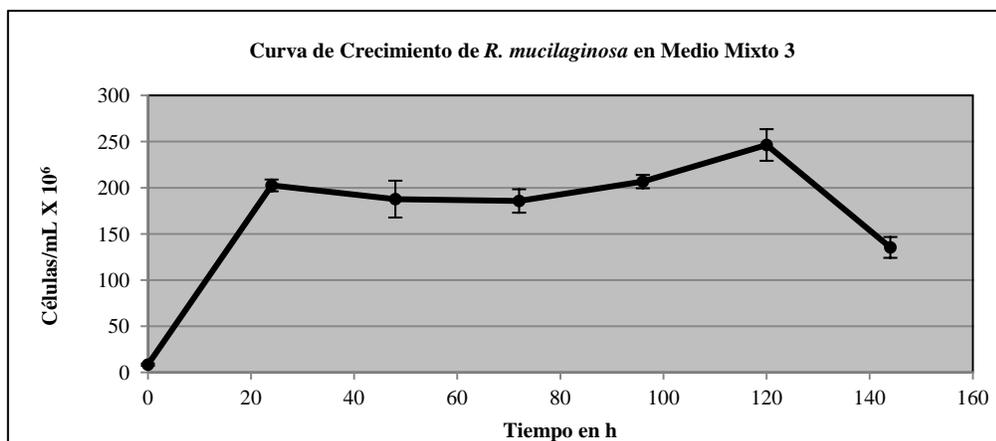


Figura 18.- Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en Medio Mixto 3

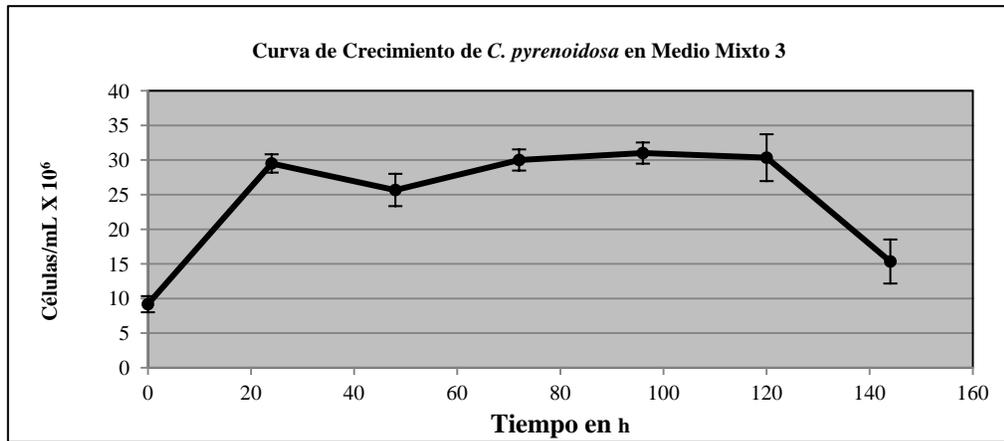
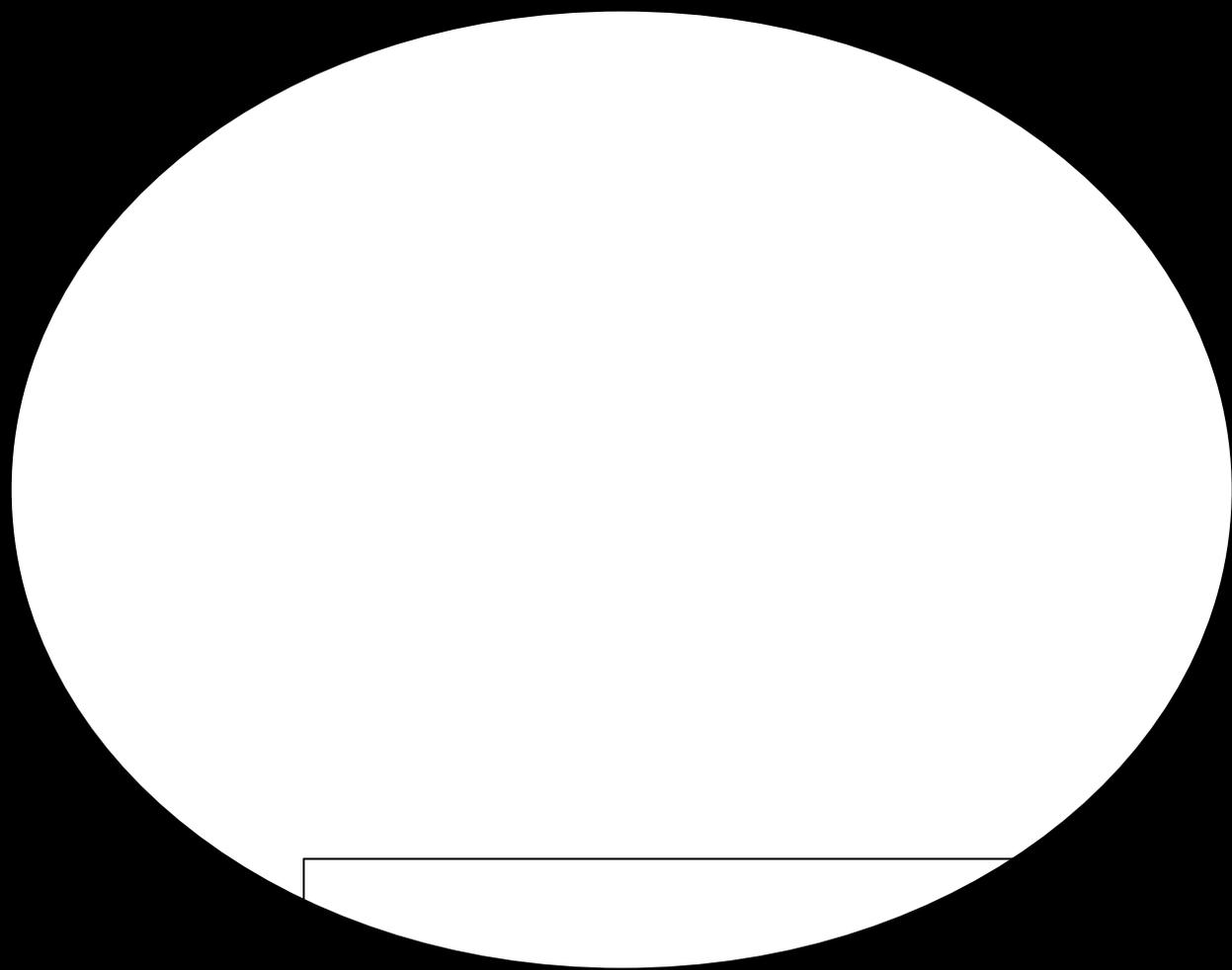


Figura 19.- Curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en Medio Mixto 3

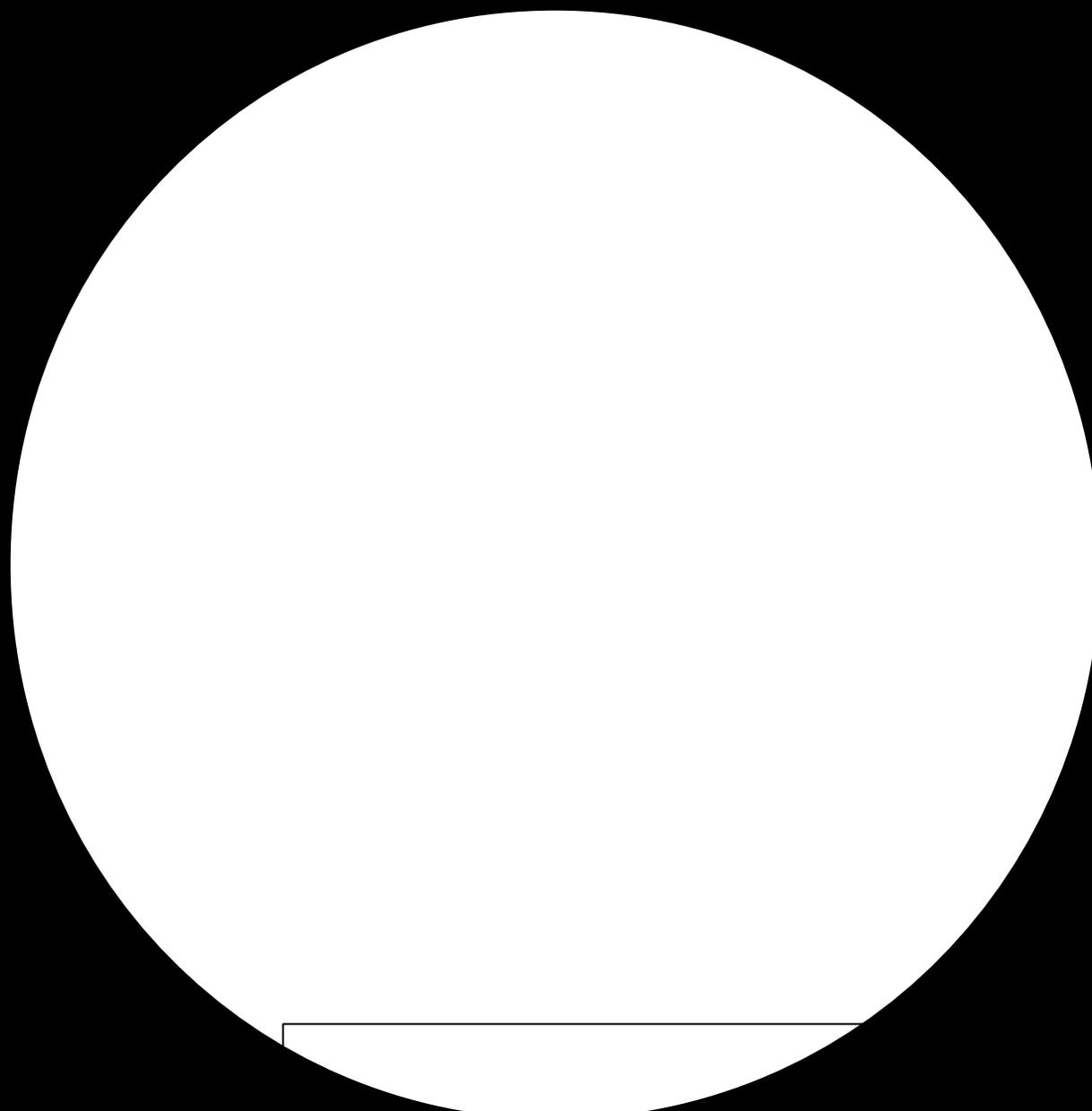
Como se observa en las figuras 18 y 19, los tiempos de incubación óptimos obtenidos para ambas cepas en el medio Mixto 3 fueron de 144 h, este fue el tiempo de incubación que se utilizó para realizar los experimentos de obtención de biomasa y producción de lípidos.

#### 7.3.1.4 Medio Mixto 4

En el medio mixto 4 ninguna de las 2 cepas fueron capaces de desarrollarse correctamente, ya que apenas a las 24 h de incubación ambas presentaron conteos celulares bajos en comparación a los otros medios, y un alto índice de muerte celular, por lo cual no se realizaron las curvas correspondientes para este medio, y por lo tanto tampoco se realizaron los experimentos de producción de biomasa y lípidos.



(1 mL de



Después de C.

Como se observó en las curvas de crecimiento, ambas cepas se desarrollaron de manera correcta cuando se colocaron juntas en un medio de cultivo desarrollado para ello. A su vez con las curvas de crecimiento se determinó el tiempo óptimo para el crecimiento de ambas cepas en conjunto. Posteriormente se realizaron los ensayos de producción de biomasa y producción de lípidos, correspondientes a los inóculos utilizados en las Curvas de crecimiento 1 y 3.

#### 7.4 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS CON *R. mucilaginosa*.

Una vez determinado el tiempo de incubación para *R. mucilaginosa* en cada uno de sus medios de cultivo, se realizaron los ensayos de producción de biomasa y lípidos, los cuales arrojaron los siguientes resultados mostrados en la siguiente tabla y figuras.

**Tabla VII. Producción de biomasa y lípidos con *R. mucilaginosa*.**

Medio de Cultivo	Biomasa (g/L)	Lípidos (g/L)	% de Lípidos
MSM1	7.14	1.17	16.31
BN	5.79	0.922	15.91
NLM	6.27 ( $\pm 0.68$ )	1.31 ( $\pm 0.15$ )	20.84 ( $\pm 0.67$ )
FM	5.08	0.86	16.87
Medio Mixto 1	6.53 ( $\pm 0.09$ )	1.05 ( $\pm 0.06$ )	16.08 ( $\pm 1.22$ )
Medio Mixto 2	4.87	0.85	17.54
Medio Mixto 3	7.93	0.97	12.2
Control positivo	-----	-----	90.54 ( $\pm 0.39$ )
Control negativo	-----	-----	0.69 ( $\pm 0.19$ )
Microorganismo control	7.63 ( $\pm 0.42$ )	0.33 ( $\pm 0.08$ )	4.38 ( $\pm 1.08$ )

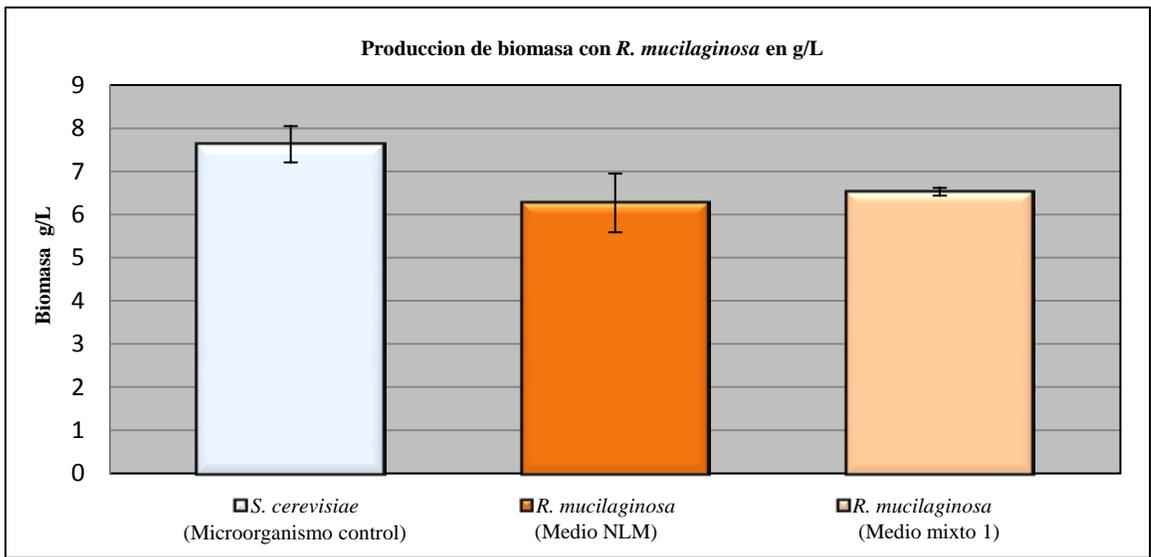


Figura 23. Producción de Biomasa con *R. mucilaginosa*

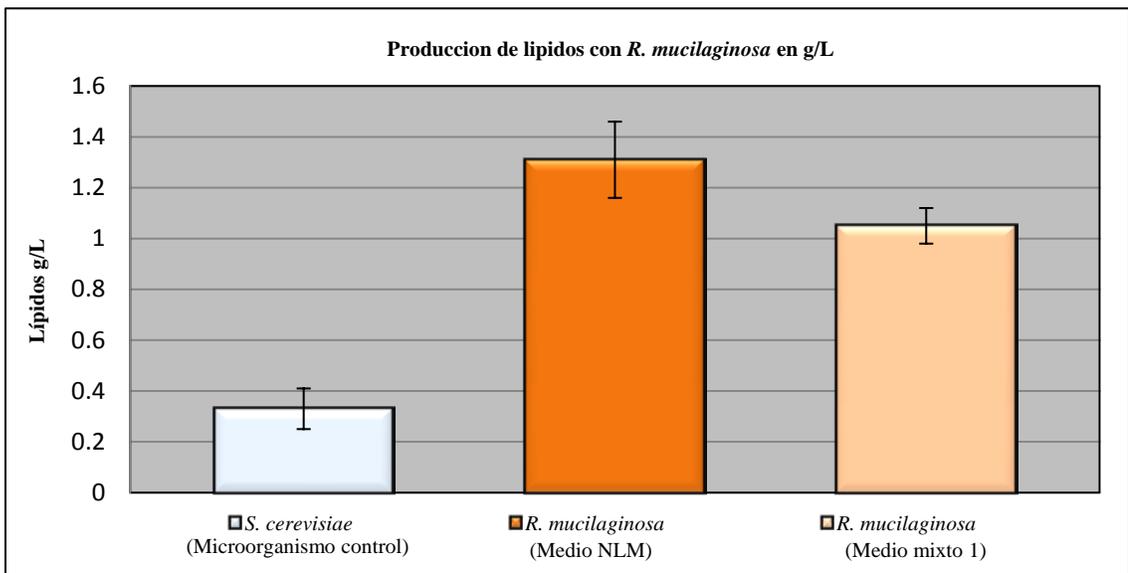


Figura 24. Producción de lípidos con *R. mucilaginosa*.

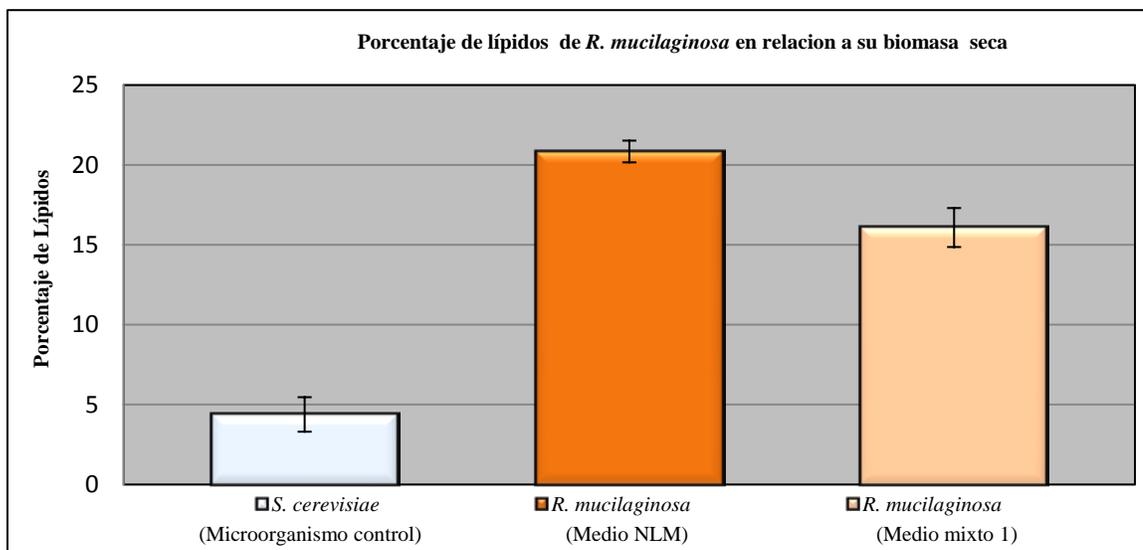


Figura 25. Porcentaje de lípidos en *R. mucilaginosa*

En los resultados se observó que entre los medios para producción de lípidos en levaduras, en el que se obtuvo la mayor productividad tanto de lípidos como de porcentaje de lípidos fue en el medio NLM, por lo cual se tomó este como el medio idóneo para *R. mucilaginosa* y se utilizó como base para el diseño de los medios mixtos. En este medio se obtuvo un porcentaje de lípidos ligeramente mayor al 20% con lo cual se confirmó que la cepa de *R. mucilaginosa* utilizada en el presente estudio se considera una cepa oleaginoso. Se observó además que de entre los medios mixtos, los mejores resultados se obtuvieron en el medio mixto 1 alcanzando valores cercanos a los obtenidos en el medio NLM. Los controles arrojaron resultados coherentes, ya que el control positivo presentó un porcentaje de recuperación de lípidos durante la extracción de poco más del 90%, con lo cual aseguramos que el método de extracción utilizado fue eficiente en comparación a los reportados en la bibliografía, mientras que el control negativo arrojó resultados cercanos al cero con lo cual aseguramos que durante la extracción de lípidos los sacáridos arrastrados son mínimos, por su parte la cepa de *S. cerevisiae* que se utilizó como microorganismo control, arrojó resultados cercanos al 5% de lípidos obtenidos en relación a su biomasa seca, asegurando de esta manera que la extracción de lípidos fue precisa y que no se arrastró materia celular no lípidica.

## 7.5 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS CON *C. pyrenoidosa*.

Al igual que con la cepa de levadura, con *C. pyrenoidosa* una vez que se determinó su tiempo de incubación en cada uno de sus respectivos medios de cultivo, se realizaron los ensayos de producción de biomasa y lípidos cuyos resultados se muestran en la tabla VIII y en las figuras 26, 27 y 28 respectivamente.

**Tabla VIII. Producción de biomasa y lípidos por *C. pyrenoidosa*.**

Medio de Cultivo	Biomasa (g/L)	Lípidos (g/L)	% de Lípidos
BN	6.51	0.31	4.79
BG11M	8.05 ( $\pm 0.44$ )	1.62 ( $\pm 0.14$ )	20.11 ( $\pm 0.77$ )
BM	8.85	0.87	9.23
MBM	9.58	1.11	11.64
Medio mixto 1	4.33 ( $\pm 0.64$ )	0.82 ( $\pm 0.13$ )	19.13 ( $\pm 2.21$ )
Medio mixto 2	6.56	0.44	6.64
Medio mixto 3	5.4	0.61	11.35
Control positivo	-----	-----	89.99 ( $\pm 1.18$ )
Control negativo	-----	-----	0.47 ( $\pm 0.16$ )
Microorganismo control	5.27 ( $\pm 0.86$ )	0.20 ( $\pm 0.02$ )	3.95 ( $\pm 0.67$ )

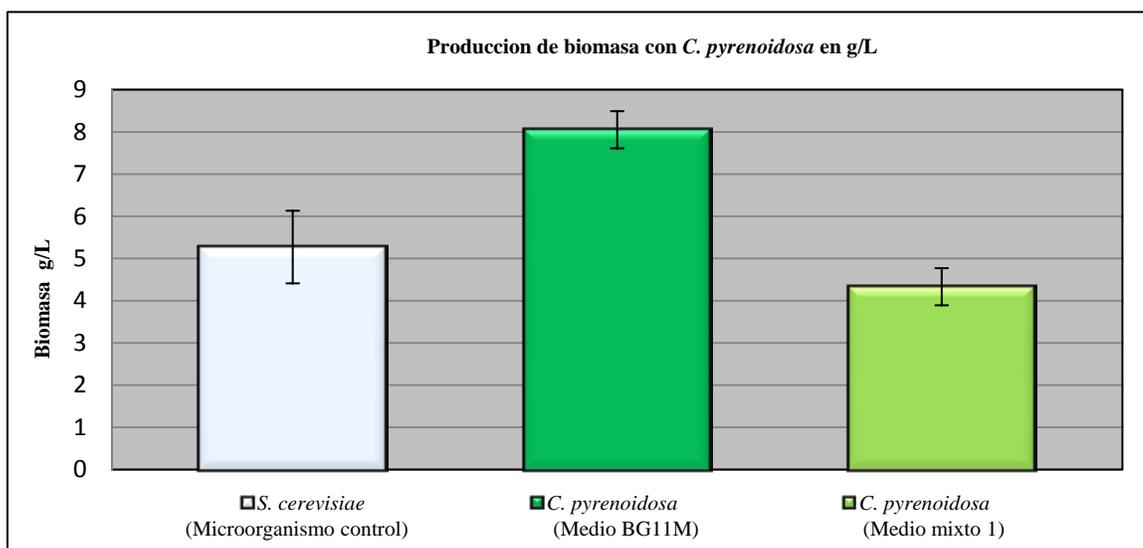


Figura 26. Producción de biomasa con *C. pyrenoidosa*.

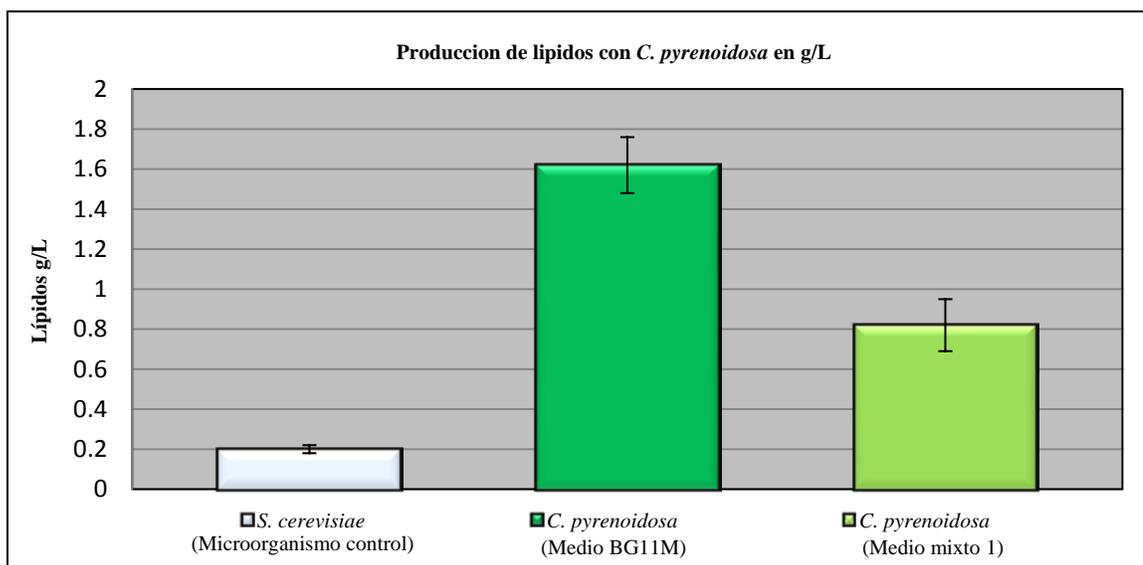


Figura 27. Producción de lípidos con *C. pyrenoidosa*.

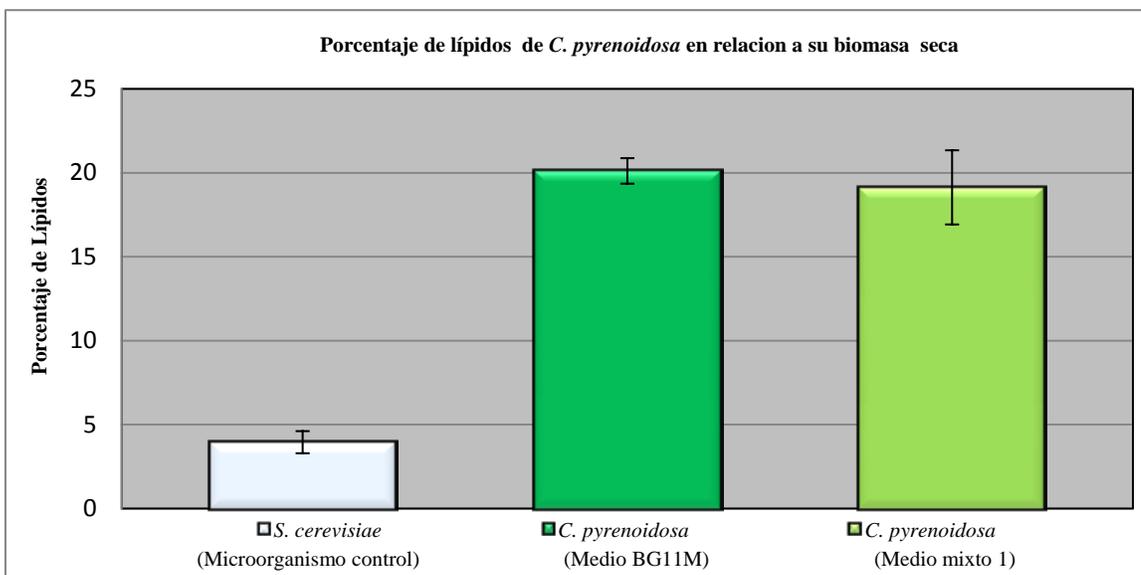


Figura 28. Porcentaje de lípidos de *C. pyrenoidosa*.

Los resultados observados con *C. pyrenoidosa* mostraron que la variación en cuanto a productividad entre los diferentes medios de cultivo es mayor a la observada que con *R. mucilaginosa*, y se determinó que el medio con el que se obtuvo mayor productividad fue el medio BG11M con el cual se superó a los resultados obtenidos con la levadura, por lo que este medio se tomó entonces como base para el diseño de los medios mixtos. A su vez, con esta cepa se logró obtener un porcentaje ligeramente mayor al 20% de lípidos en relación a su biomasa seca, con lo cual afirmamos que ambas cepas utilizadas durante el presente estudio se encuentran dentro de la clasificación de microorganismos oleaginosos. Además se observó que el medio mixto en el que se obtuvieron los mejores resultados para *C. pyrenoidosa* fue el medio mixto 1, por lo cual se estableció este medio de cultivo para realizar en el cultivo sinérgico de ambas especies. Todos los controles utilizados arrojaron resultados coherentes, asegurando así una correcta y efectiva aplicación del método de extracción de lípidos.

## 7.6 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS CON AMBOS MICROORGANISMOS EN UN CULTIVO MIXTO.

Una vez que se determinó tanto el medio de cultivo mixto en el que ambas cepas mejor se desarrollaron de manera independiente y las condiciones en las que llevaron a cabo una relación sinérgica, se realizaron los ensayos de producción de biomasa y lípidos con ambas cepas creciendo en un cultivo mixto. Los resultados se muestran a continuación en la tabla IX y en las figuras 29, 30 y 31.

**Tabla IX.- Producción de biomasa y lípidos por ambas cepas en un cultivo mixto..**

Tipo de Inóculo	Biomasa (g/L)	Lípidos (g/L)	% de Lípidos
Sinergia 1	9.51 ( $\pm$ 0.45)	1.37 ( $\pm$ 0.04)	14.45 ( $\pm$ 0.28)
Sinergia 3	9.35 ( $\pm$ 0.23)	1.26 ( $\pm$ 0.04)	13.53 ( $\pm$ 0.69)
Control positivo	-----	-----	91.06 ( $\pm$ 1.13)
Control negativo	-----	-----	0.90 ( $\pm$ 0.13)
Microorganismo control	5.93 ( $\pm$ 0.51)	0.26 ( $\pm$ 0.05)	4.42 ( $\pm$ 0.58)

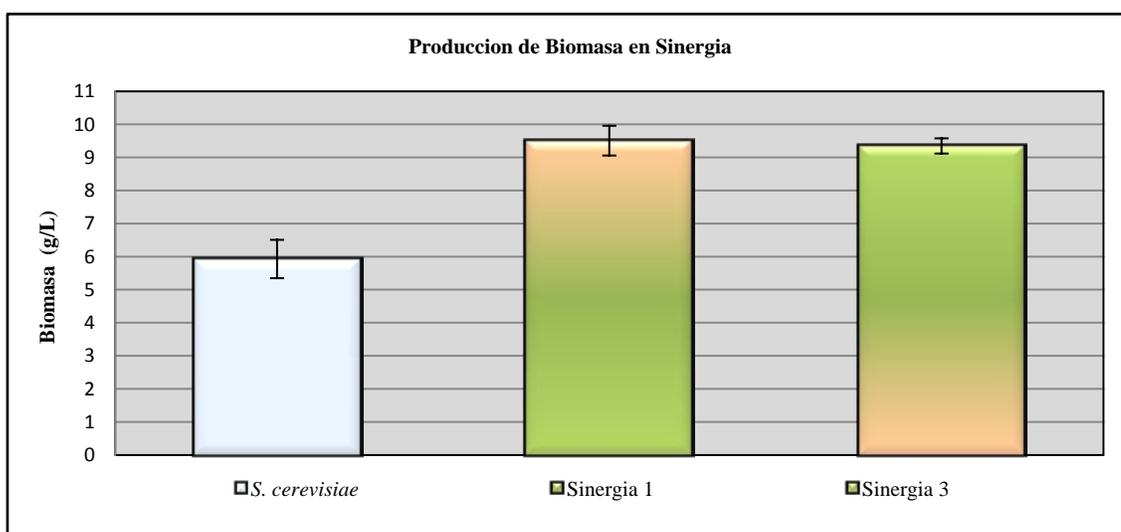


Figura 29. Producción de biomasa con ambas cepas en dos distintas sinergias.

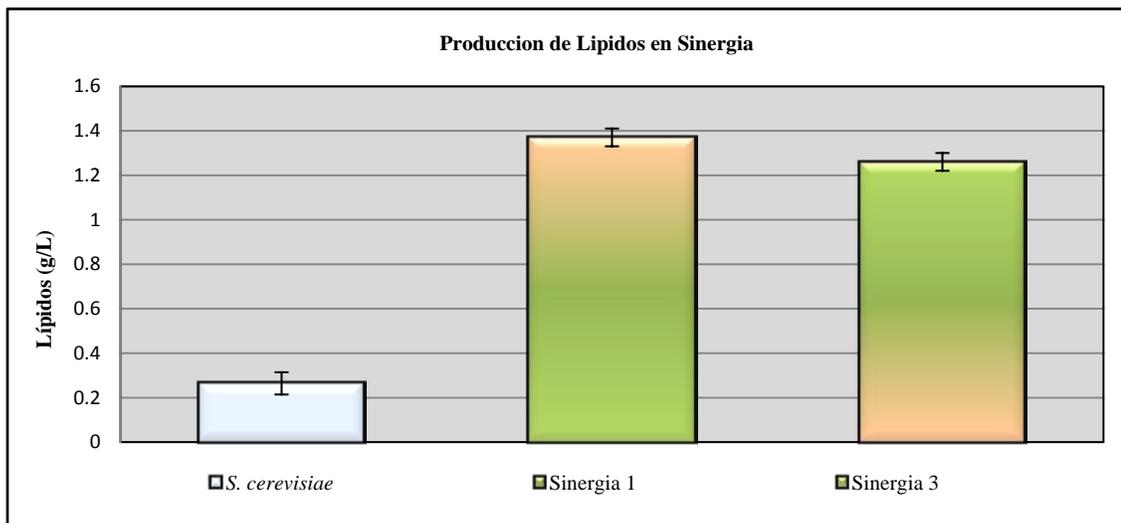


Figura 30. Producción de lípidos con ambas cepas en dos distintas sinergias.

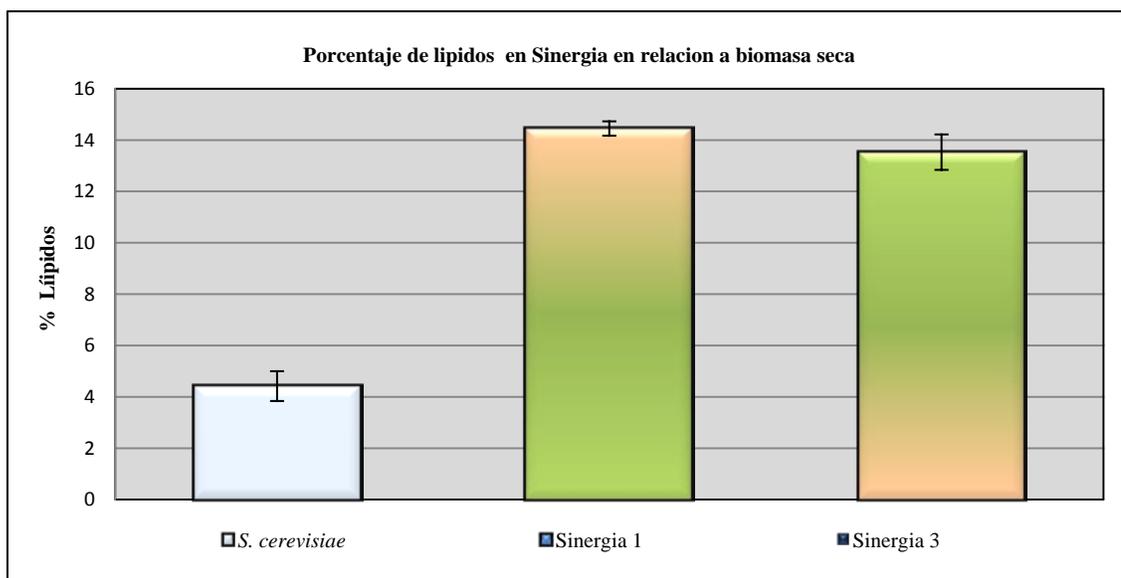


Figura 31. Porcentaje de lípidos de ambas cepas en dos distintas sinergias.

Al utilizar ambas cepas creciendo en conjunto en un medio mixto diseñado para ello, se observó que en ambos tipos de inóculos utilizados se superó 1 g/L de producción de

lípidos y los valores de producción de biomasa alcanzaron casi los 10 g/L, lo cual muestra una marcada sinergia para producción de biomasa y lípidos en comparación a las cepas creciendo por separado en el mismo medio de cultivo. Sin embargo los porcentajes de lípidos se mantuvieron bajos y en ninguno de los casos se alcanzó el 20%. A su vez se observan resultados ligeramente mayores en rendimiento para la sinergia No. 1 en comparación a la sinergia No. 3. Por lo cual se decidió realizar el análisis de los ácidos grasos para la sinergia No. 1.

### **7.7 ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LAS CEPAS CRECIENDO DE MANERA INDEPENDIENTE Y EN CONJUNTO.**

Se logró obtener un análisis de los ácidos grasos presentes en cada una de las cepas así como de ambos microorganismos creciendo en conjunto, de esta manera se determinó la factibilidad de la producción de un biocombustible a partir de los ácidos grasos presentes en ellas. En todos los casos se observó que los ácidos grasos de cadenas entre 16 y 18 carbonos representan más de 90% del total de la muestra. Además en todos los casos se observó un alto porcentaje de ácidos grasos oleico y linoleico los cuales además presentan propiedades nutricionales y terapéuticas importantes.

El análisis de los ácidos grasos presentes en cada una de las cepas creciendo de manera independiente y por separado se realizó de acuerdo a la metodología antes descrita en el punto 6.2.4. A continuación se muestran las tablas con los porcentajes de cada ácido graso en cada una de las muestras y sus cromatogramas.

Tabla X. Porcentajes de ácidos grasos en *R. mucilaginosa*.

Ácido graso	Porcentaje
C:14 Mirístico	0.525 %
C:16 Palmítico	9.81 %
C:16:1 Palmitoleico	2.341%
C:17 Margárico	0.349 %
C:17:1 Heptadenocenoico	0.478 %
C:18:0 Esteárico	5.007 %
C:18:1 Oleico	75.738 %
C:18:2 Linoleico	1.012 %
C:20:0 Araquídico	0.315 %
C:20:1 Gadoleico	0.992 %
C:22:0 Behénico	0.598 %
C:24:0 Lignocerico	2.835 %
<b>Total</b>	<b>100%</b>

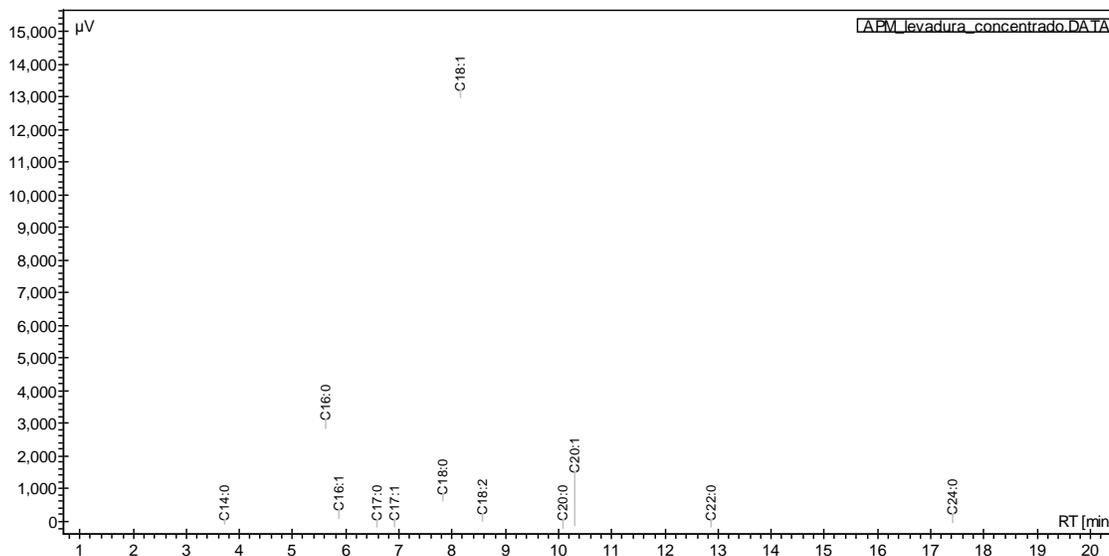


Figura 32.- Cromatograma del análisis de ácidos grasos de *R. mucilaginosa*

Tabla XI.- Porcentajes de ácidos grasos en *C. pyrenoidosa*.

Ácido graso	Porcentaje
C:14 Mirístico	0.548 %
C:15 Pentadecílico	0.453 %
C:16 Palmítico	20.212 %
C:16:1 Palmitoleico	1.41 %
C:18:0 Esteárico	5.839 %
C:18:1 Oleico	29.362 %
C:18:2 Linoleico	31.566 %
C:18:3 Linolénico	10.319 %
C:20:0 Araquídico	0.131 %
C:20:1 Gadoleico	0.160 %
<b>Total:</b>	<b>100 %</b>

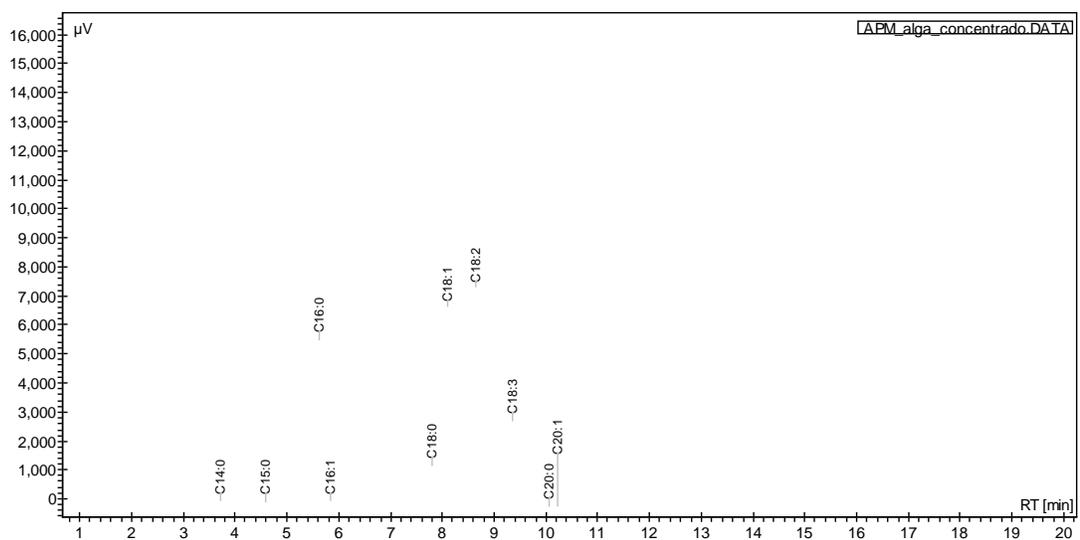


Figura 33.- Cromatograma del análisis de ácidos grasos de *C. pyrenoidosa*

Tabla XII.- Porcentajes de ácidos grasos de ambas cepas creciendo en conjunto.

Ácido graso	Porcentaje
C:14 Mirístico	1.215 %
C:15 Pentadecílico	0.33 %
C:16 Palmítico	20.199 %
C:16:1 Palmitoleico	3.865 %
C:18:0 Estearico	13.576 %
C:18:1 Oleico	31.138%
C:18:2 Linoleico	25.340 %
C:18:3 Linolénico	2.455 %
C:20:0 Araquídico	0.244 %
C:20:1 Gadoleico	0.291 %
C:24:0 Lignocérico	1.347 %

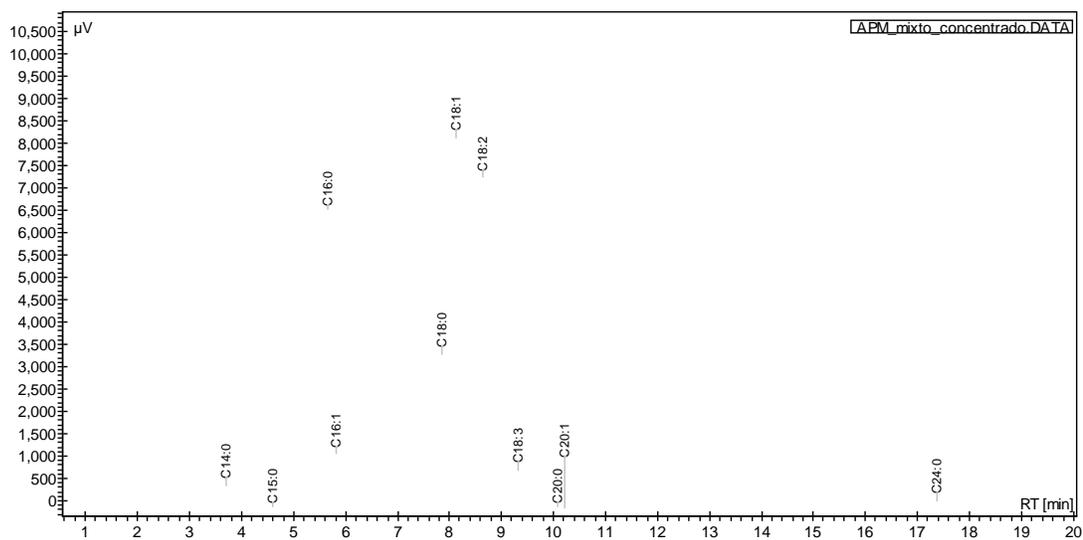


Figura 34.- Cromatograma del análisis de ácidos grasos de ambas cepas creciendo en conjunto.

## 7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se comenzó por realizar una prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar que los datos correspondientes a los resultados mostraran una distribución normal, los resultados se muestran en la tabla a continuación:

Tabla XIII. Prueba de Kolmogorov-Smirnov

N		18
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	1.23978
	Desviación típica	.304702
Diferencias más extremas	Absoluta	.100
	Positiva	.100
	Negativa	-.095
Z de Kolmogorov-Smirnov		.422
Sig. asintót. (bilateral)		.994

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Acorde a lo observado en la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los datos muestran una distribución normal por lo cual se puede aplicar el modelo de One-Way ANOVA para su posterior comparación de medias. A continuación se muestra la tabla de ANOVA obtenida con el programa SPSS.

Tabla XIV. Prueba estadística de ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1.158	5	.232	6.605	.004
Intra-grupos	.421	12	.035		
Total	1.578	17			

El análisis de varianza nos mostró que existe una diferencia significativa entre los resultados de los experimentos con un estadístico de prueba  $F = 6.605$  y una significancia de 0.004. Por último se realizó una comparación entre las medias utilizando la prueba de Scheffé, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla XV. Comparación entre las medias por prueba de Scheffé

Scheffé <sup>a</sup>	<i>Chlorella</i> medio mixto	3	.81833		
	<i>Rhodotorula</i> medio mixto	3	1.04900	1.04900	
	Sinergia 3	3	1.26333	1.26333	
	<i>Rhodotorula</i> en medio idoneo	3	1.30933	1.30933	
	Sinergia 1	3	1.37333	1.37333	
	<i>Chlorella</i> en medio idóneo	3		1.62533	
	Sig.		.078	.064	
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.					

La comparación entre las medias por la prueba de Scheffé, nos mostró que solo se encuentran diferencias significativas entre *C. pyrenoidosa* creciendo en su medio idóneo en relación a los demás resultados, y *C. pyrenoidosa* creciendo en el medio mixto en relación a los demás resultados correspondientemente.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados anteriores mostraron que las cepas de *R. mucilaginosa* y *C. pyrenoidosa* utilizadas durante este estudio se encuentran dentro de la clasificación de microorganismos oleaginosos, ya que se logró obtener poco más de 20% de lípidos en relación a su biomasa seca, con una productividad mayor a 1 g/L de lípidos totales extraídos. Esto es importante ya que ambas cepas fueron aisladas en el área metropolitana de Monterrey y han demostrado resistencia a condiciones ambientales extremas (Garza-González, 2005). Dicha importancia recae en la tendencia del uso de productos de desecho como materias primas para el crecimiento de microorganismos y obtención de productos de interés, por lo que estas cepas presentan características explotables para el ser humano. Sin embargo, en cuanto al uso de microorganismos para la potencial producción de biodiesel se han reportado cepas que alcanzan porcentajes mayores a los observados durante esta investigación, por lo que si se quisieran utilizar estas cepas para la producción de lípidos a gran escala y posterior transesterificación a biodiesel, se tendrían que buscar condiciones de crecimiento o modificaciones genéticas con las cuales la producción de lípidos se vea aumentada notablemente.

Estas cepas por separado mostraron perfiles de ácidos grasos en los que se observó que la cepa de *R. mucilaginosa* al desarrollarse en un medio idóneo para levaduras generó un 93.9% de ácidos grasos de cadena larga de C:16 y C:18 (16 y 18 carbonos), se observó además que el 79.09% de los ácidos grasos presentes en dicha cepa presentaron insaturaciones. Lo anterior nos indica *R. mucilaginosa* podría llegar a ser una buena fuente de materia prima para la producción de biodiesel dadas las características de sus lípidos, sin embargo como se mencionó anteriormente se tendrían que modificar ciertas características ambientales o propias de la cepa para que esto sea costeable.

Por su parte el perfil de ácidos grasos de *C. pyrenoidosa* muestra que el 98.6% del total de los ácidos grasos presentes en la muestra están conformados por ácidos grasos C:16 y C:18, por lo cual se podría considerar que los lípidos presentes en esta cepa presentan

mejores características para su uso como materia prima de producción de biodiesel en comparación a *R. mucilaginosa*. Además se observó que 41.88% de los ácidos grasos están representados por los llamados Omega 6 y 3 (C:18:2 Linoleico y C:18:3 Linolénico) en porcentajes de 31.56% y 10.32% respectivamente, lo cual aunque no tiene relación con el presente proyecto, es de importancia dadas las características nutricionales y terapéuticas adjudicadas a dichos ácidos grasos esenciales.

Además durante la presente investigación se logró constatar que ambas cepas pueden producir casi un 20% de lípidos en relación a su biomasa seca, utilizando los mismos nutrientes como sustrato, lo cual se comprobó con los resultados de los experimentos de producción de biomasa y lípidos con el Medio Mixto 1, en los que si bien la producción no alcanzó los niveles de las cepas creciendo por separado en sus condiciones idóneas, al menos alcanzó niveles comparables. Lo anterior deja abierta la posibilidad a la formulación de una fuente de nutrientes provenientes de desechos industriales o agropecuarios con la cual se podría trabajar tanto con algas como con levaduras, con lo cual la investigación en este rubro podría avanzar más rápido.

Se confirmó también que las cepas pueden crecer juntas en un mismo medio de cultivo, y que los resultados obtenidos en producción de biomasa y lípidos fueron mayores al utilizar ambas cepas creciendo en conjunto en comparación a las cepas creciendo por separado al utilizar el medio de cultivo diseñado durante el estudio, lo cual refuerza la idea de que las algas y levaduras pueden interaccionar a manera de sinergia, sin embargo los mecanismos de la potencial sinergia entre ambas cepas no ha sido determinado hasta el momento, por lo que se supone podría ser debido a que algunos de los metabolitos de desecho ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) de alguna o de ambas cepas, pueden ser de utilidad para el crecimiento y desarrollo de la otra. En adición, las cepas si bien se desarrollaron correctamente en conjunto, el aumento en la producción de biomasa y lípidos no llegó a ser un porcentaje tan alto como se ha observado en otros estudios donde los resultados del conjunto de las cepas sobrepasan en más de un 100% a los resultados de las cepas independientes, y los resultados obtenidos con *C. pyrenoidosa* creciendo en un medio idóneo para algas, superó estadísticamente a las cepas creciendo en conjunto.

El perfil de ácidos grasos obtenido de las cepas creciendo en conjunto reveló que el 96.57% de los ácidos grasos están conformados por C:16 y C:18 y que de estos el 62.8 % presentan insaturaciones. Lo anterior es un claro indicador de la capacidad potencial de ambas cepas de generar una materia prima útil para la fabricación de biodiesel, aunque existen distintas limitantes.

## 9. CONCLUSIONES

Las cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Chlorella pyrenoidosa* aisladas en el área metropolitana de Monterrey se catalogan como cepas oleaginosas ya que acumulan una cantidad  $\geq 20\%$  de lípidos en relación a su biomasa seca y tienen una productividad mayor a 1 g/L. En las condiciones idóneas para cada cepa, *C. pyrenoidosa* alcanzó una mayor productividad en comparación a la cepa de *R. mucilaginosa*.

Las cepas *C. pyrenoidosa* y *R. mucilaginosa* se desarrollan utilizando los mismos nutrientes e incluso pueden crecer de manera conjunta, presentando una mayor productividad de biomasa y lípidos en comparación a las cepas creciendo por separado en el mismo medio de cultivo.

Existe sinergia en la producción de biomasa y lípidos al utilizar los microorganismos *C. pyrenoidosa* y *R. mucilaginosa* creciendo en el medio mixto 1.

La mayor productividad de acumulación de lípidos la alcanzó la cepa de *C. pyrenoidosa* creciendo durante 168 h en el medio BG11M a una temperatura de 30 °C con agitación de 150 rpm.

Los perfiles de ácidos grasos de las cepas creciendo por separado como en cultivo mixto presentan una cantidad muy alta ( $\geq 95\%$ ) de ácidos grasos de cadena larga, principalmente C:16 y C:18.

La cepa de de *C. pyrenoidosa* creciendo de manera independiente produce una mayor cantidad de ácidos grasos esenciales (Omega 6 y Omega 3), los cuales pudieran tener utilidad en el área nutricional o terapéutica.

## 10.LITERATURA CITADA

1. Ageitos J, Vallejo J, Veiga-Crespo P, Villa T. 2011. Oil yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90: 1219 – 1227.
2. Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia M, De Lucia M, Leonardi A, Rossi M. 2010. Single cell oils from the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial cell Factories*. 9: 73 – 79.
3. AOAC. 2003. Official Method 969.33 Fatty Acids in Oils and Fats, Preparation of Methyl Esters Boron Trifluoride Method.
4. Bligh E, Dyer W. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37:911-917
5. Camacho-Rubio F, Martínez-Sancho M, Sánchez-Villasclaras F. 1987. Contenido de clorofila en *Chlorella pyrenoidosa* durante el crecimiento heterotrófico sobre monosacáridos. *AFINIDAD*. 44: 151 - 153
6. Campbell M. 2008. Biodiesel: Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel. *Guelph Engineering Journal*. 1: 2 – 7
7. Castillo C, Henao D, Tejeda L. 2010. Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas *Dunalliella salina* y *Chlorella nativa* como materia prima para la producción de biodiesel. World Congress and Exhibition ENGINEERING, Buenos Aires, Argentina, Octubre 17-20.

8. Cheirsilp B, Suwannarat W, Niyomdecha R. 2011. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology*. 28: 362 – 368.
9. Chen F, Johns M. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*. 3: 203 – 209.
10. Chi Z, Liu G, Zhao S, Li J, Peng Y. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 1227- 1241
11. Chiu, Y, Kao Y, Tsai T, Ong C, Chen C, Lin S. 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*. 100: 833-838
12. Cho, Haeng D, Hyong M, Kim E. 2004. Biosorption of lead (Pb<sup>+2</sup>) from aqueous solution by *Rhodotorula aurantiaca*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 250 – 255.
13. Chun-Hai Z, Tong Z, Mei L, Zhen-Ming C. 2010. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochemistry*. 45: 1121-1126.

14. Cuan-Chao D, Jie T, Feng X, Yi-Jun D, Mo Z. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*. 6: 2130 – 2134.
15. Cuimin-Hu, Zhao X, Zhao J, Siguo W, Zhao K. 2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium thoruloides*. *Bioresource Technology*. 100: 4843 – 4847.
16. Dourval-Courchesne N, Parisien A, Wang B, Lan C. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*. 141: 31 - 41
17. Easterling E, French W, Hernandez R, Licha M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*. 100: 356 – 361.
18. Evans C, Scragg A, Ratledge C. 1981. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides, *European Journal of Biochemistry*. 132: 609–615.
19. Fakas S, Papanikolaou S, Batsosa A, Galiotou-Panayotou M, Mallouchosa A, Aggelis G. 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioengineering*. 33:573–80.
20. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*.

1956. 226: 497 – 509

21. Francisco E, Neves D, Jacob-Lopes E, Franco T. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85: 395-403.
22. Garza-Gonzalez T. 2005. Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb(II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Tesis (Doctorado), Universidad de la Habana, Cuba.
23. Gonzalez D, Kafarov V, Guzman A. 2009. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect*. 7: 53-60.
24. Gouveia L, Marques A, Lopes da Silva T, Reis A. 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:821-826.
25. Gouveia L, Oliveira A. 2009. Microalgae as a raw material for biodiesel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 269-274.
26. Harrison. 1927. Description of *Rhodotorula* spp. Disponible en el sitio de red: <http://www.doctorfungus.org/thefungi/Rhodotorula.htm> [Revisado el 20 de Julio de 2011]
27. Hassan M, Blanc J, Granger M, Pareilleux A, Goma G. 1996. Influence of

nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*. 31: 355–61.

28. Heredia-Arroyo T, Wei W, Hu B. 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 162: 1978-1995.

29. Huang G, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G. 2010. Biodiesel production by microalgal technology. *Applied Energy*. 87: 38 - 46

30. Karatay S, Dönmez G. 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*. 101: 7988 – 7990.

31. Kausch P, Hague J, Oliver M, Li Y, Daniell H, Mascia P, Watrud S, Stewart N. 2010. Transgenic perennial biofuels feedstocks and strategies for bioconfinement. *Biofuels* 1: 163 – 176.

32. Laoteng K, Certic M, Cheevadhanark S. 2011. Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Chemical Papers*. 65: 97 – 103.

33. Lebsky V. 2004. Lipid defense response of *Chlorella* as theoretical background in wastewater treatment for pollutants. *Revista Mexicana de Fisica*. 50: 4 – 6.

34. Leasing R, Kookkhunthod S. 2011. Heterotrophic growth of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production using molasses as a carbon substrate. International Conference on Food Engineering and Biotechnology. 9: 87 – 91.
35. Leasing R, Kookkhunthod S, Nontaso N. 2011. Microalgal lipid production by Microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2. World Academy of Science, Engineering and Technology. 76: 499 – 502.
36. Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology. 80:749–756.
37. Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan C. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. Applied Microbiology and Biotechnology 8: 629-636.
38. Li Z, Yuan H. 2008. Responses of *Rhodotorula* sp. to cadmium. Biometals. 21: 613 – 621.
39. Li-Xia P, Deng-Feng Y, Li S, Wei L, Gui-Guang C, Zhi-Qun L. 2009. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. Food Technology and Biotechnology. 47: 215-220
40. Liang, Y., Sarkany N, Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnology Letters. 31:1043-1049.
41. Libkind D, Brizzio S, Van-Broock. 2004. *Rhodotorula mucilaginosa*, a

carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high altitude lake. *Folia Microbiology*. 49: 19 – 25.

42. Loera-Quezada, Olguin E. 2010. Las microalgas oleaginosas como productoras de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. 1: 91 – 116

43. Lopez-Chuken U, Young S, Guzman-Mar L. 2010. Evaluating a ‘biotic ligand model’ applied to chloride-enhanced Cd uptake by *Brassica juncea* from nutrient solution at constant Cd<sup>2+</sup> activity. *Environmental Technology*. 31: 307 – 318.

44. Lunde C, Drew D, Jacobs A, Tester M. 2007. Exclusion of Na<sup>+</sup> via Sodium ATPase ensures normal growth of *Physcomitrella patens* under moderate salt stress. *Plant Physiology*. 144: 1786 – 1796.

45. Mandal S, Mallick N. 2009. Microalgae *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84: 281-291.

46. Mata T, Martins A, Caetano N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 217 - 232

47. Matsunaga T, Matsumoto M, Maeda Y, Sugiyama H, Sato R, Tanaka T. 2009. Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024 toward biofuel production. *Biotechnology Letters*. 31:1367-1372.

48. Mazzuca-Sobczuka T, Chisti Y. 2010. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85:100-108.
49. Mei L, Guang-Lei L, Zhe C, Zhen-Ming C. 2009. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*. 34: 101 – 107.
50. Mendoza H, Molina A, de la Jara A, Nordström L, Freijanes K, Carmona L. 2008. Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas Aceites* 59: 27-32.
51. Miao X, Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 6: 841-846
52. Miao X, Wu Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126: 499 – 507
53. Muhid F, Nawi W, Kader A, Yussof W, Hamid A. 2008. Effects of metal ion concentrations on lipid and Gamma linolenic acid production by *Cunninghamella* sp. 2A1. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 8: 62 – 67.
54. Pan J, Kwak Y, Rhee S. 1986. High density cell culture of *Rhodotorula*

*glutinis* using oxygen-enriched air. *Biotechnology Letters*. 8: 715– 718.

55. Patil V, Tran K, Hiselrod H. 2008. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*. 9: 1188 – 1195

56. Penglin L, Xiaoling M, Rongxiu L, Jianjiang Z. 2011. In situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 41: 375 – 383.

57. Reyes-Chaves L. 2005. Remoción de metales pesados de disoluciones sintéticas utilizando biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa*. Tesis (QFB). Universidad Autónoma de Nuevo León.

58. Rodolfi L, Zitelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici M. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 102: 100 – 102.

59. Sánchez S, Martínez M, Espejo M, Pacheco R, Espínola F, Hodaifa G. 2001. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mil wastewater as the nutrient medium. *Journal of Applied Phycology*. 13: 443 – 449.

60. Santos A, Janssen M, Lamers P, Evers W, Wijffels R. 2011. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology*. 104: 593 – 599.

61. Scarsella M, Parisi M, De Filipis P, Bravi M. 2009. Achievements and perspectives in heterotrophic and mixotrophic culturing of microalgae. AIDIC Conference Series. 9: 277 – 282
62. Scott S, Davey M, Dennis J, Horst I, Howe C, Lea-Smith D, Smith A. 2010. Biodiesel From Algae: Challenges and Prospects. Current Opinion in Biotechnology. 21: 277 – 286.
63. Shen Y, Yuan W, Pei Z, Mao E. 2010. Heterotrophic cultura of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources. Applied Biochemistry and Biotechnology. 160: 1674 – 1684.
64. Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Didicohen S, Cohen Z, Merzylac M. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. Journal of Applied Phycology. 20: 245 - 251
65. Someshekar D, Joseph R. 2000. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 16: 491 – 493.
66. Takagi M, Karseno S, Yoshida T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101: 223-226.
67. Tani A, Inoue C, Tanaka Y, Yamamoto Y, Kondo H, Hyradate S, Kimbara

K, Kawai F. 2008. The crucial role of mitochondrial regulation in adaptive aluminum resistance in *Rhodotorula glutinis*. *Microbiology*. 154: 3437 – 3446.

68. Tripathi N, Gaur P. 2006. Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma*. 229: 1 – 9.

69. Vyas P, Verma L, Subrahmanyam N. 2010. A review on FAME production process. *Fuel*. 89: 1 - 9

70. Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. 2009. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 162: 1174 – 1186.

71. Wei A, Zhang X, Wei D, Chen G, Wu Q, Yang S. 2009. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology*. 36: 1383-9138.

72. Widjaja A. 2009. Lipid production from microalgae as a promising candidate for biodiesel production. *Makara Teknologi* 13: 47 – 51

73. Xiong W, Li X, Xiang J, Wu Q. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78: 29 – 36

74. Wei-Xiong, Lixia-Liu, Chao-Wu, Chen-Yang, Quingyu-Wu. 2010. <sup>13</sup>C Tracer and gas chromatography-mass spectrometry analysis reveal metabolic flux distribution in the oleaginous microalgae *Chlorella protothecoides*. *Plant physiology*. 154: 1001 - 1011
75. Xue F, Miao J, Zhang X, Luo H, Tan T. 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*. 99: 5923 – 5927.
76. Xue F, Miao J, Zhang X, Tan T. 2010. A new strategy for lipid production by mix cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 2010. 160: 498 – 503.
77. Yamauchi H, Mori H, Kobayashi T, Shimizu S. 1986. Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputer aided-fed-batch culture. *Journal of Fermentation Technology*. 161: 275–280.
78. Yeh K, Chang J. 2011. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. *Journal of Biotechnology*. 11: 1358 – 1366.
79. Yoo C, Jun S, Lee J, Ahn C, Oh H. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*. 101: 71 – 77

## APÉNDICE A

### LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Cels	Células
mL	Mililitro
<i>C. protothecoides</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>
<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>C. pyrenoidosa</i>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
MSM1	Minimal Salts Medium 1
BN	Bajo Nitrógeno
NLM	Nitrogen Limited Medium
FM	Fermentation Medium
BN	Bajo Nitrógeno
BG11M	BG11 Modificado
BM	Bristol Modificado
MBM	Medio Basal Modificado
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SO <sub>x</sub>	Óxidos de Azufre
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
TAGs	Triacilglicéridos
NO <sub>x</sub>	Óxidos de Nitrógeno
pH	Potencial de Hidrógeno
Kg	Kilogramo
ASTM	American Society for Testing and Materials
L	Litros
mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	Milímetros cuadrados sobre segundos
°C	Grados Celsius

W	Watts
h	Horas
min	Minutos
m	Metros
mg	Miligramos
KOH	Hidróxido de Potasio
g	Gramos
µm	Micrómetros
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
rpm	Revoluciones por Minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
NADPH	Dinucleótido Fosfato de Nicotinamida y Adenina
ATP	Adenosín Trifosfato
<i>R. glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>R. glacialis</i>	<i>Rhodotorula glacialis</i>
PDA	Patata Dextrosa Agar
O <sub>2</sub>	Oxígeno Gas
µL	Microlitros
min	Minutos
N	Concentración de Normalidad
ppm	Partes por millón
DS	Desviación Estándar
ESM	Error Estándar de la Media
kPa	Kilopascales

## APÉNDICE B

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de todos los medios de cultivo y soluciones se utilizó agua desionizada proporcionada por el Almacén General de Reactivos de la Facultad de Ciencias Químicas U.A.N.L.

- **Preparación de Medios de Cultivo**

**Solución de sales para algas:** Se colocan 90 mL de agua desionizada en un matraz de aforación. Se agregan 500  $\mu$ L de la solución A, 500  $\mu$ L de la solución B, 100  $\mu$ L de la solución C, y 400  $\mu$ L de la solución D, y 1 g de glucosa, se agita manualmente y se afora a 100 mL. Se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min. La solución se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio semisólido para el mantenimiento de algas:** Se agregan los compuestos y soluciones de la misma manera que la solución de sales para algas, se agrega 1.5 g de agar bacteriológico y se disuelve con ayuda de un agitador magnético y calor. Se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y justo después de esterilizarse se coloca en placas petri estériles y se almacenan en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio de enriquecimiento para levaduras:** Se pesan y agregan a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 2.5 g de glucosa, 1.25 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de Extracto de Levadura y 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , se agregan 100 mL de agua desionizada, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Patata Dextrosa Agar:** Se pesan y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 3.9 g de Agar PDA (Proporcionado por el almacén general de reactivos de la Facultad de Ciencias Químicas U.A.N.L.) y se agregan 100 mL de agua desionizada, se disuelve con ayuda de un agitador magnético y calor, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y justo después de la esterilización se coloca en placas petri estériles. Se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Minimal Salts Medium 1:** Se pesan y agregan a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 4 g de glucosa, 0.04 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.04 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.075 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 g de extracto de levadura, 0.0286 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , se agregan 100 mL de agua desionizada y se disuelve con ayuda de un agitador magnético, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración hasta su posterior uso.

**Medio Bajo en Nitrógeno (Para levaduras):** Se pesan y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 8 g de glucosa, 1.25 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.19 g de extracto de levadura y se agregan 100 mL de agua desionizada, se disuelve con ayuda de un agitador magnético, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración hasta su posterior uso.

**Nitrogen Limited Medium:** Se pesan y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL 10 g de glucosa, 0.8 g de extracto de levadura, 0.3 g de peptona y se agregan 100 mL de agua desionizada, se disuelve con ayuda de un agitador magnético, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Fermentation Medium:** Se pesan y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 5.4 g de glucosa, 0.0215 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 g de extracto de levadura, 0.04g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , se agregan 100 mL de agua desionizada y se ajusta el pH a 6 utilizando soluciones de NaOH ó HCl 1 N, se esteriliza el medio de cultivo con calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio Bajo en Nitrógeno (Para algas):** Se pesan, miden y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 0.0101 g de  $\text{KNO}_3$ , 0.0027 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.0098 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0029 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL de solución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.28 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.18 mg/L, 1 mL de solución de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.022 mg/mL, 1 mL de solución  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.008 mg/mL, 1 mL de solución de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0019 mg/mL, 1 mL de solución  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.55 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.73 mg/mL, 1 g de glucosa y se afora a 100 mL con agua desionizada, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración hasta su posterior uso.

**Medio BG11 modificado:** Se pesan, miden y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL 0.15 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.04 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0036 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL de solución de Acido cítrico 0.6 mg/L, 1 mL de solución de Citrato de fierro y amonio 0.6 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mg/mL, 0.002 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 5 g de glucosa, se afora a 100 mL y se ajusta el pH a 7 utilizando  $\text{NaOH}$  ó  $\text{HCl}$  1 N, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio Bristol Modificado:** Se pesan, miden y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL 0.025 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.0075 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.0175 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.0025 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.0025 g de  $\text{NaCl}$ , 0.0075 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1 mL de solución de  $\text{FeCl}_3$  0.03 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03 mg/mL, 1 mL de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.02 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{CuSO}_4$  0.006 mg/mL, 2 g de Glucosa, se afora con agua desionizada a 100 mL y se ajusta a un pH de 7 con  $\text{NaOH}$  ó  $\text{HCl}$  1 N, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración hasta su posterior uso.

**Medio Basal Modificado:** Se pesan y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL 0.24 g de  $\text{KNO}_3$ , 0.125 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g de  $\text{EDTA}$ , 0.0114 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.0111 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0049 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0088 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,

0.0014 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0016 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.0005 g de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 g de Glucosa y se añaden 100 mL de agua desionizada, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración hasta su posterior uso.

**Medio Mixto 1:** Se pesan, miden y colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 0.12 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.038 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.036 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml de solución de ácido cítrico 0.6 mg/mL, 1 mL de solución de citrato de fierro y amonio 0.6 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mg/mL, 0.002 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.16 g de extracto de levadura, 0.06 g de peptona, 5 g de glucosa y se afora a 100 mL con agua desionizada, se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio Mixto 2:** Se pesan, miden y colocan 0.015 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.005 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0036 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL de solución de citrato de fierro y amonio 1 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mg/mL, 0.001 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.72 g de extracto de levadura, 0.27 g de peptona, 10 g de glucosa 100g/L, se afora a 100 mL con agua desionizada y se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min, se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio Mixto 3:** Se pesan, miden y agregan a un matraz de 250 mL 0.075 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.02 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.004g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0018 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mL de solución de ácido cítrico 0.6 mg/mL, 0.5 mL de solución de citrato de fierro y amonio 0.6 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1m mg/mL, 0.001 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.4 g de extracto de levadura, 0.15 g de peptona, 7.5 g de glucosa, se afora a 100 mL con agua desionizada y se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Medio Mixto 4:** Se pesan, miden y agregan a un matraz Erlenmeyer de 250 mL 0.0375 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.01 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.002  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.018 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mL de solución de Ácido cítrico 0.6 mg/mL, 0.5 mL de solución de citrato de fierro y amonio 0.6 mg/mL, 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mg/mL, 0.005 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.2

g de extracto de levadura, 0.075 g de peptona, 4 g de glucosa, se afora a 100 mL con agua desionizada y se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

- **Soluciones**

**Solución Salina Estéril:** Se pesan y colocan en un frasco de 250 mL con tapa 0.85 g de NaCl, se agregan 100 mL de agua desionizada y se agita hasta disolver. Se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

**Solución Cloroformo/Metanol 2:1:** Se miden en una probeta 200 mL de cloroformo y se colocan en un frasco con taparosca de 500 mL, se miden 100 mL de metanol con una probeta y se colocan en el mismo frasco, se agita la solución y se almacena hasta su posterior uso.

## Resumen Autobiográfico



Gustavo Raúl Reyna Martínez

Candidato para el grado de:

**Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología**

**Tesis:**

**PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR CEPAS NATIVAS DE *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* Y GENERACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO**

**Campo de estudio:** Microbiología

### **Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en San Nicolás de los Garza N.L, el 10 de Agosto de 1988, hijo de Gustavo Raúl Reyna Sánchez y María Guadalupe Martínez.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 2008.

**Publicaciones:** Gomez-Flores, R., Reyna-Martinez, R., Tamez-Guerra, P., Quintanilla-Licea, R. 2012. Antibacterial activity of *Oenothera rosea* (L 'Hér) leaf extracts. 2012. British Journal of Medicine and Medical Research. 2 (3): 396-404. ISSN: 2231-0614. <http://www.sciencedomain.org/issue.php?iid=120&id=12>.